

ELAINE ROSECHRRER CARBONERO

**POLISSACARÍDEOS DE FUNGOS LIQUENIZADOS CONTENDO
DIFERENTES FOTOBIONTES**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

CURITIBA

2005

ELAINE ROSECHRRER CARBONERO

**POLISSACARÍDEOS DE FUNGOS LIQUENIZADOS CONTENDO
DIFERENTES FOTOBIONTES**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

CURITIBA

2005

Em especial ao Prof. Marcello Iacomini que tanto me ensinou e incentivou a concretização deste trabalho.

Aos meus pais João e Zeni, e ao Valnir por serem
presentes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcello Iacomini, pela palavra sempre amiga e confiante, pela dedicação, apoio e sobretudo por ter acreditado em mim, minha eterna gratidão.

Ao Prof. Philip A. J. Gorin, pelos ensinamentos científicos, pelo contínuo estímulo, pela orientação e pelo exemplo de uma vida dedicada à pesquisa.

À Patrícia Maria Stuelp-Campelo, pelos ensinamentos durante o início como aluna de Iniciação Científica, pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos meus pais João e Zeni, pelo apoio incondicional sempre presente e a preocupação para que os meus objetivos fossem alcançados.

Ao Valnir pelo amor, apoio, amizade, incentivo incondicional, paciência e compreensão da minha ausência.

Aos Professores Dr. Teuvo Ahti (Departamento de Botânica da Universidade de Helsinki, Helsinki, Finlândia), Dra. Sionara Eliasaro (Departamento de Botânica – UFPR), Dra. Sandra Mara Woranovicz-Barreira (Departamento de Farmácia -UFPR), Dra. Selene Elíffio Esposito (Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC-PR) e Dra. Elfriede Stocker-Wörgötter (Institute of Plant Physiology, University of Salzburg, Salzburg, Austria) pela coleta e/ou identificação dos líquens estudados.

À Profa. Dra. Sionara Eliasaro pelas inúmeras conversas sobre os fascinantes fungos liquenizados.

Ao Anderson, Ana Helena, Fhernanda, Giovana e Rafaela (ordem alfabética para não haver briga!!!) pela ajuda e pelos incansáveis momentos experimentais, muito obrigado.

Aos Professores Dr. Guilherme L. Sassaki e Dr. Miguel Daniel Nosedá, pela disponibilidade para a realização das análises de RMN e/ou GC-MS.

Ao Dr. Giangiacomo Torri e ao Sr. Cesare Cosentino (Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche “G. Ronzoni”, Milano, Italy), pela realização de inúmeras análises espectroscópicas.

Ao César A. Tischer pela amizade e pela realização das análises de RMN e GC-MS realizadas no início deste trabalho.

À Profa. Fany Reicher, pelo acompanhamento do trabalho, pelos conselhos e apoio nesta caminhada.

Às Professoras Juliana Maurer Menestrina e Fany Reicher, pela análise crítica da tese, como integrantes da banca interna. Com muita admiração, agradeço as sugestões e auxílio nesta etapa tão importante.

Às minhas eternas amigas Caroline Mellinger e Ana Helena, pela imensa amizade que conseguimos cultivar. Espero que, embora nossos caminhos possam tomar rumos distintos a partir de agora, nós consigamos manter a amizade sincera.

Ao pessoal dos laboratórios 247, E-1 e 252: Thales, Ricardo, Fernanda (a metódica), Lucimara, Juliana, Lauro, Rodrigo Reis, Ana Helena, Caroline, Breno, Rodrigo Vassoler, Dirce, Ricardo, Andréia, Fhernanda, Maria Luiza, João, Roger, entre outros, pelos momentos de convivência e colaboração.

Aos colegas de laboratório “anexos”: Adriano, Paula, Rosiane, Ana Paula Newton, Tatiane, Marcos, Gerusa, Diogo, Juliana Cassolato, entre outros (é difícil lembrar de todos!!!), pelas horas de descontração.

Aos “antigos” amigos da Química de Carboidratos, Patrícia, Selene, Cíntia, Sandra, Renato, César, Clarice, pela amizade e experiências compartilhadas.

Ao meu grande amigo Fábio Rogério Rosado, pela amizade, conversas, trabalhos em conjunto, etc.

À Andréia Ticiane (T), pela amizade sincera em todos os momentos de nossa convivência.

À Rosane pela amizade e disponibilidade para a realização de inúmeras análises de GC-MS.

À companheira de trabalho dos finais de semana e feriado, Gracielle Viccini.

Ao Thales (Barão), pela amizade sincera conquistada desde o curso de graduação.

Ao meu amigo Ricardo, pela amizade, paciência, disposição em ajudar a qualquer momento e aos bons momentos de convivência.

Às coordenadoras do Curso de Pós-Graduação, Profa. Leda Satie Chubatsu e Profa. Maria Eugênia R. Duarte, pelo empenho e dedicação prestados e ao crescimento e reconhecimento deste curso.

À minha madrinha Profa. Helena Simões Duarte por ter inspirado a escolher a minha profissão.

Ao meu amigo Luís Antonio da Motta pelo incentivo dado durante o decorrer deste percurso. Ah, você não conseguiu me convencer a escolher outra profissão.

Ao meu irmão João Antonio Carbonero....com saudades....

Às minhas “filhas de coração”, Michaela e Anne Eliz.

À Dona Marilza pela presença alegre e prestativa.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, pela colaboração e amizade.

À família Pereira Gracher, pelos momentos de descontração, ensinamentos e apoio prestados no período pré-defesa.

À CAPES, PRONEX- Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

A todos que, de algum modo, influenciaram positivamente nesta caminhada, toda admiração e reconhecimento.

A Deus, por permitir a realização de todos os meus objetivos.

A mais bela experiência que podemos ter é a do mistério. É a emoção fundamental existente na origem da verdadeira arte e ciência. Aquele que não a conhece e não pode se maravilhar com ela está praticamente morto e seus olhos estão ofuscados.

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS	XVI
RESUMO.....	XVIII
ABSTRACT.....	XIX
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 LIQUENS	1
1.1.1 Histórico.....	1
1.1.2 Aspectos Gerais.....	2
1.2 PRINCIPAIS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS LIQUENS.....	6
1.2.1 Substâncias Liquênicas.....	6
1.2.2 Carotenóides.....	7
1.2.3 Carboidratos de Baixa Massa Molar	7
1.2.4 Carboidratos de Alta Massa Molar.....	8
1.3 IMPORTÂNCIA QUIMIOTAXONÔMICA DOS POLISSACARÍDEOS LIQUÊNICOS.....	18
1.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS LIQUENS ESTUDADOS.....	19
1.4.1 <i>Cladina</i> spp (Família Cladoniaceae).	22
1.4.2 <i>Dictyonema glabratum</i> (Família Dictyonemataceae)	22
1.4.3 <i>Leptogium</i> spp. (Família Collemataceae).	22
1.4.4 <i>Parmotrema</i> spp. e <i>Rimelia</i> spp. (Família Parmeliaceae).	23
1.4.5 <i>Roccella decipiens</i> (Família Roccellaceae)	23
1.4.6 <i>Umbilicaria mamullata</i> (Família Umbilicariaceae).....	24
2 OBJETIVOS.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 FUNGOS LIQUENIZADOS	26
3.1.1 <i>Cladina</i> spp.	26
3.1.2 <i>Dictyonema glabratum</i>	26

3.1.3 <i>Leptogium</i> spp.	27
3.1.4 <i>Parmotrema</i> spp.	27
3.1.5 <i>Rimelia</i> spp.	27
3.1.6 <i>Roccella decipiens</i>	28
3.1.7 <i>Umbilicaria mammulata</i>	28
3.2 PROCEDIMENTOS GERAIS DE EXTRAÇÃO	28
3.2.1 Extração Clorofórmio-Metanol	28
3.2.2 Extração Metanol-Água.....	29
3.2.3 Extração Aquosa.....	29
3.2.4 Extração Alcalina	29
3.2.5 Extração com Dimetilsulfóxido	30
3.3 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS.....	30
3.3.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo.....	30
3.3.2 Purificação dos Polissacarídeos com Solução de Fehling	30
3.3.3 Purificação dos Polissacarídeos por Ultrafiltração ou Diálise em Membranas..	31
3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS.....	32
3.4.1 Composição Monossacarídica.....	32
3.4.1.1 Hidrólise ácida total.....	32
3.4.1.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise.....	32
3.4.2 Teste de Homogeneidade e Determinação da Massa Molecular	33
3.4.2.1 Cromatografia em gel permeação.....	33
3.4.2.2 Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS).....	33
3.4.3 Metilação.....	34
3.4.3.1 Metanólise.....	34
3.4.3.2 Hidrólise para formar os produtos parcialmente <i>O</i> -metilados.....	35
3.4.4 Dosagem de Ácidos Urônicos.....	35
3.4.5 Carboxi-redução do Heteropolissacarídeo Ácido Isolado do Líquen <i>Leptogium</i> sp.	35
3.4.6 Degradação de Smith.....	36

3.4.7 Hidrólise Ácida Parcial.....	37
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	37
3.5.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)	37
3.5.2 Cromatografia de Partição em Papel (CP).....	38
3.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	38
3.5.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
4.1 Polissacarídeos de <i>Cladina</i> spp.....	40
4.1.1 Caracterização Estrutural das Frações IKP (insolúveis em KOH 0,5%; nigeranas)	41
4.1.2 Caracterização Estrutural das Frações SKP (solúveis em KOH 0,5%; laminaranas)	43
4.1.3 Caracterização Estrutural da Fração Precipitado de Fehling (PF; galactoglucomananas).....	44
4.1.4 Caracterização Estrutural das Frações Sobrenadantes de Fehling (SF; galactomanoglucanas).....	46
4.2 α -Glucana (1→3)-ligada, β -xilana (1→4)-ligada e β -manana (1→6)-ligada de <i>Dictyonema glabratum</i>	49
4.3 Polissacarídeos de <i>Leptogium</i> sp.....	55
4.3.1 Polissacarídeos Obtidos por Extrações Aquosas	56
4.3.2 Polissacarídeos Obtidos por Extração Alcalina	66
4.3.2.1 Caracterização estrutural da fração precipitado de Fehling (PFSK-La; galactomanana)	66
4.4 Polissacarídeos de <i>Parmotrema</i> spp. e <i>Rimelia</i> spp.....	72
4.4.1 Liquenanas e nigeranas da Fração Precipitado de Congelamento-degelo (PK2)	73
4.4.2 Galactoglucomananas da Fração Precipitado de Fehling (PFK2).	79
4.4.3 β -Glucana (1→6) da Fração Precipitado de Fehling (PFK10) de <i>P.</i> <i>mantiqueirense</i>	85
4.5 Polissacarídeos de <i>Rocella decipiens</i>	88
4.5.1 Laminarana Presentes na Fração Insolúvel em Água Fria	89

4.5.2 Caracterização Estrutural das Galactofuranomananas Presentes na Fração Solúvel em Água Fria.....	90
4.6 β -Glucana (1 \rightarrow 6)-ligada, β -glucana (1 \rightarrow 3)-ligada e galactofuranomanana de <i>Umbilicaria mammulata</i>	95
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
REFERÊNCIAS	108
ANEXOS.....	121

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Tipos de talos líquênicos: folioso (ex: <i>Xanthoria polycarpa</i>), crustoso (ex: <i>Diploicia canescens</i>) e fruticoso (ex: <i>Usnea subfloridana</i>).....	3
FIGURA 2	- Corte transversal de <i>Canomaculina pilosa</i> (Stiz.) Elix & Hale em eletromicrografia de varredura.....	4
FIGURA 3	- Principais estruturas observadas em galactomananas obtidas de líquens.....	11
FIGURA 4	- Esquema da estrutura proposta para o <i>core</i> da galactomanana obtida de <i>Lasallia pustulata</i> após remoção por hidrólise parcial das unidades de Galf.....	13
FIGURA 5A	- Fragmentos dos líquens dos gêneros <i>Cladina</i> (<i>C. arbuscula</i> , <i>C. confusa</i> , <i>C. substenius</i>), <i>Dictyonema</i> (<i>D. glabratum</i>), <i>Leptogium</i> (<i>L. azureum</i> , <i>Leptogium</i> sp.), <i>Parmotrema</i> (<i>P. austrosinense</i> e <i>P. delicatulum</i>).....	20
FIGURA 5B	- Fragmentos dos líquens dos gêneros <i>Parmotrema</i> (<i>P. mantiqueirense</i> , <i>P. schindlerii</i> e <i>P. tinctorum</i>), <i>Rimelia</i> (<i>R. cetrata</i> e <i>R. reticulata</i>), <i>Roccella</i> (<i>R. decipiens</i>) e <i>Umbilicaria</i> (<i>U. mammulata</i>).....	21
FIGURA 6	- Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos de <i>Cladina</i> spp.....	41
FIGURA 7	- Espectros de RMN- ¹³ C da fração insolúvel em KOH 0,5% (IKP; nigeranas) em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ (70°C) obtidos de <i>Cladina arbuscula</i> (A), <i>C. confusa</i> (B) e <i>C. substenius</i> (C).....	43
FIGURA 8	- Espectros de RMN- ¹³ C da fração solúvel em KOH 0,5% (SKP; laminaranas) em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ (70°C) obtidos de <i>C. arbuscula</i> (A), <i>C. confusa</i> (B) e <i>C. substenius</i> (C).....	44
FIGURA 9	- Regiões anoméricas dos espectros de RMN- ¹³ C das frações precipitado de Fehling (PF; galactoglucomanana) em D ₂ O (30°C) obtidas de <i>C. arbuscula</i> (A), <i>C. confusa</i> (B) e <i>C. substenius</i> (C).....	45
FIGURA 10	- Regiões anoméricas dos espectros de RMN- ¹³ C das frações sobrenadante de Fehling (SF; galactomanoglucana) em D ₂ O (30°C) obtidas de <i>Cladina arbuscula</i> (A), <i>C. confusa</i> (B) e <i>C. substenius</i> (C).....	47
FIGURA 11	- Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos do líquen <i>Dictyonema glabratum</i>	49
FIGURA 12	- Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos de <i>Leptogium</i> spp.....	55
FIGURA 13	- Espectros de RMN- ¹³ C da fração PW (laminarana) em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ (70°C) obtida de <i>L. azureum</i> (A) e <i>Leptogium</i> sp. (B).....	56
FIGURA 14	- Perfil de eluição das frações SCW-La (A) e 16ESC-La (B) (solubilizadas em H ₂ O MilliQ) em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS).....	58
FIGURA 15	- Perfil de eluição das frações 14RSC-La (A) e 14ESC-La (B) (solubilizadas em H ₂ O MilliQ) em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (AUX) (HPSEC-MALLS).....	59
FIGURA 16	- Espectros de RMN- ¹³ C das frações 14RSC-La (A) e 14ESC-La (B) em D ₂ O (30°C) obtidas de <i>L. azureum</i>	61
FIGURA 17	- Perfil de eluição, por HPSEC, das frações PFHW-La (A) e PFHW-L2 (B) (solubilizadas em nitrito de sódio 0,1 mol.l ⁻¹ , contendo azida sódica).....	62
FIGURA 18	- Espectros de RMN- ¹³ C (A) e DEPT (B) da fração PFHW-L2 em D ₂ O (30°C).....	63

FIGURA 19	- Espectro de RMN- ¹³ C da fração PFHW-La em D ₂ O (30°C).....	64
FIGURA 20	- Espectro de RMN- ¹³ C da fração P1-L2 em D ₂ O (30°C).....	65
FIGURA 21	- Perfil de eluição, por HPSEC, das frações PFSK-La (em cinza) e RPF-La (em preto) (solubilizadas em H ₂ O MilliQ).....	67
FIGURA 22	- Espectro de RMN- ¹³ C da galactomanana (RPF) isolada de <i>L. azureum</i> (em D ₂ O, 50°C).....	69
FIGURA 23	- Espectro de ¹ H, ¹³ C HMQC da galactomanana isolada de <i>L. azureum</i> (em D ₂ O, 50°C).....	70
FIGURA 24	- Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos de fungos liquenizados do gênero <i>Parmotrema</i> e <i>Rimelia</i>	72
FIGURA 25	- Espectros de RMN- ¹³ C da fração precipitado de congelamento e degelo (PGD) obtida de <i>Parmotrema austrosinense</i> (A), <i>P. delicatulum</i> (B), <i>P. mantiqueirense</i> (C), <i>P. schindlerii</i> (D), <i>P. tinctorum</i> (E), <i>Rimelia cetrata</i> (F) e <i>R. reticulata</i> (G).....	74
FIGURA 26	- Espectro de RMN- ¹³ C da fração PIAA (nigerana), em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ a 50°C, obtida de <i>Rimelia cetrata</i>	75
FIGURA 27	- Espectros de RMN- ¹³ C da fração PSAA (liquenanas) obtida de <i>Parmotrema austrosinense</i> (A), <i>P. delicatulum</i> (B), <i>P. mantiqueirense</i> (C), <i>P. schindlerii</i> (D), <i>P. tinctorum</i> (E), <i>Rimelia cetrata</i> (F) e <i>R. reticulata</i> (G).....	75
FIGURA 28	- Perfil de eluição da fração obtida após degradação de Smith de PSAA (A) e dos padrões: 2- <i>O</i> -β-D-glucopiranosil-D-eritritol (B) e eritritol (C), obtido por HPLC (coluna HPX-87H 300 x 780 mm - AMINEX® ion exclusion-BIO RAD).....	77
FIGURA 29	- Perfil de eluição, por HPSEC, das frações precipitado de Fehling (PFK2) obtida de <i>Parmotrema austrosinense</i> (PF-Pa), <i>P. delicatulum</i> (PF-Pd), <i>P. mantiqueirense</i> (PF-Pm), <i>P. schindlerii</i> (PF-Ps), <i>P. tinctorum</i> (PF-Pt), <i>Rimelia cetrata</i> (PF-Rc) e <i>R. reticulata</i> (PF-Rr).....	81
FIGURA 30	- Espectros de RMN- ¹³ C da fração precipitado de Fehling (PFK2; galactoglucomanana) obtida de <i>Parmotrema austrosinense</i> (A), <i>P. delicatulum</i> (B), <i>P. mantiqueirense</i> (C), <i>P. schindlerii</i> (D), <i>P. tinctorum</i> (E), <i>Rimelia cetrata</i> (F) e <i>R. reticulata</i> (G).....	84
FIGURA 31	- Espectro de HSQC-DEPT do heteropolissacarídeo isolado de <i>Parmotrema austrosinense</i> (em D ₂ O a 30°C).....	82
FIGURA 32	- Perfil de eluição, por HPSEC, da fração PFK10 (solubilizada em H ₂ O MilliQ), obtida do líquen <i>P. mantiqueirense</i>	86
FIGURA 33	- Espectro de RMN- ¹³ C da fração PFK10 em D ₂ O (30°C).....	86
FIGURA 34	- Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos do líquen <i>Rocella decipiens</i>	88
FIGURA 35	- Espectros de RMN- ¹³ C da fração IW (A) e IK (B) (laminaranas), em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ a 70°C, obtida do líquen <i>Rocella decipiens</i>	90
FIGURA 36	- Perfil de eluição das frações PFK (A), SFK (B) (solubilizadas em H ₂ O MilliQ), RSF (C) e ESF (D) (solubilizadas em nitrato de sódio 0,1 mol.l ⁻¹ , contendo azida sódica) obtidas do líquen <i>R. decipiens</i> , em HPSEC.....	91
FIGURA 37	- Espectros de RMN- ¹³ C das frações RSF (A), ESF (B), HRSF (C) (amostras solubilizadas em D ₂ O, 30°C) e SmRSF (D) (em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ , 50°C).....	92
FIGURA 38	- Espectros de RMN- ¹³ C das frações PFK (A) HPF (B) (em D ₂ O, 30°C) e SmPF (B) (em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ , 50°C).....	94

FIGURA 39	- Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos do líquen <i>Umbilicaria mammulata</i>	98
FIGURA 40	- Espectro de RMN- ¹³ C da fração PM (pustulana parcialmente <i>O</i> -acetilada), em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ (70°C), obtida do líquen <i>Umbilicaria mammulata</i>	99
FIGURA 41	- Espectro de RMN- ¹³ C da fração SF-SK (laminarana), em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ (50°C), obtida do líquen <i>Umbilicaria mammulata</i>	100
FIGURA 42	- Perfil de eluição das frações SF-SK (A) e TZeSF (B) (solubilizadas em nitrito de sódio 0,1 mol.l ⁻¹ , contendo azida sódica) obtidas do líquen <i>Umbilicaria mammulata</i> , em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS).....	101
FIGURA 43	- Espectros de RMN- ¹³ C das frações TZeSF (A) e HP10 (B), em D ₂ O (30°C), obtidas do líquen <i>Umbilicaria mammulata</i>	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Tipos de glucanas encontradas em fungos liquenizados.....	9
TABELA 2	- Tipos de heteropolissacarídeos encontrados em fungos liquenizados.....	12
TABELA 3	- Polissacarídeos obtidos de fungos liquenizados.....	14
TABELA 4	- Composição monossacarídica e rendimento dos polissacarídeos obtidos de <i>Cladina</i> spp.....	42
TABELA 5	- Dados de RMN- ¹³ C e ¹ H das nigeranas (IKP) e laminaranas (SKP), obtidos de <i>Cladina</i> spp.....	43
TABELA 6	- Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PF; galactoglucomanana) obtidas de <i>Cladina</i> spp.....	46
TABELA 7	- Análise por metilação da fração sobrenadante de Fehling (SF; galactomanoglucana) obtidas de <i>Cladina</i> spp.....	48
TABELA 8	- Composição monossacarídica das frações isoladas de <i>D. glabratum</i> ...	50
TABELA 9	- Análise por metilação dos polissacarídeos obtidos de <i>D. glabratum</i> ...	51
TABELA 10	- Dados de RMN- ¹³ C e ¹ H para os polissacarídeos isolados de <i>D. glabratum</i>	52
TABELA 11	- Composição monossacarídica e rendimento das frações sobrenadante de gelo/degelo obtidas de <i>Leptogium</i> spp.....	57
TABELA 12	- Composição monossacarídica das frações obtidas de <i>Leptogium</i> spp..	60
TABELA 13	- Análise por metilação da galactomanana obtida de <i>L. azureum</i>	68
TABELA 14	- Composição monossacarídica e rendimento da fração PFK2 obtida dos líquens <i>Parmotrema</i> spp. e <i>Rimelia</i> spp.....	79
TABELA 15	- Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PFK2; galactoglucomanana) obtidas de <i>Parmotrema</i> spp. e <i>Rimelia</i> spp.....	82
TABELA 16	- Composição monossacarídica das frações obtidas do líquen <i>Roccella decipiens</i>	89
TABELA 17	- Análise por metilação das frações obtidas de <i>Roccella decipiens</i>	93
TABELA 18	- Análise por metilação das frações TzeSF e HP10 obtidas de <i>Umbilicaria mammulata</i>	102
TABELA 19	- Polissacarídeos obtidos nas espécies de fungos liquenizados estudados.....	105

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS

μl	- Microlitro
μm	- Micrometro
\sim	- Aproximadamente
^{13}C	- Carbono treze
^1H	- Próton
3-O-MeGal	- 3-O-metil-galactopirranose
Ac_2O	- Anidrido acético
Ag_2CO_3	- Carbonato de prata
AgNO_3	- Nitrato de prata
BaCO_3	- Carbonato de bário
CH_3I	- Iodeto de metila
CHCl_3	- Clorofórmio
COSY	- <i>Correlation spectroscopy</i>
CuSO_4	- Sulfato de cobre
d.i.	- Diâmetro interno
D_2O	- Óxido de deutério
DEPT	- <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
f	- Furanosídico
Gal	- Galactose
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
Glc	- Glucose
h	- Hora
H_2O	- Água
H_2SO_4	- Ácido sulfúrico
HCl	- Ácido clorídrico
HMQC	- <i>Heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy</i>
HOAc	- Ácido acético
HPLC	- <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>
HPSEC-MALLS	- Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS)
HSQC	- <i>Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy</i>
Hz	- Hertz
IR	- Índice de refração
J	- Constante de acoplamento
kDa	- kilodaltons
KOH	- Hidróxido de potássio
LS	- Espalhamento de luz
M	- Molar
Man	- Manose
Me_2SO	- Dimetilsulfóxido
$\text{Me}_2\text{SO}-d_6$	- Dimetilsulfóxido deuterado

MeOH	- Metanol
mg	Miligrama
min	- Minuto
ml	- Mililitros
NaB ² H ₄	- Boroidreto de sódio deuterado
NaBH ₄	- Boroidreto de sódio
NaIO ₄	- Periodato de sódio
NaN ₃	- Azida de sódio
NaNO ₂	- Nitrito de sódio
NaOAc	- Acetato de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
<i>p</i>	- Piranosídico
p/v	- Peso/volume
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	- Partes por milhão
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	- <i>Rotational nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
rpm	- Rotações por minuto
TFA	- Ácido trifluoracético
TOCSY	- <i>Total correlation spectroscopy</i>
v/v	- Volume/volume
Xyl	- Xilose

RESUMO

As estruturas de polissacarídeos obtidas de 15 espécies de fungos liquenizados (*Cladina arbuscula*, *C. confusa*, *C. substenius*, *Dictyonema glabratum*, *Leptogium azureum*, *Leptogium* sp., *Parmotrema austrosinense*, *P. delicatulum*, *P. schindlerii*, *P. mantiqueirense*, *P. tinctorum*, *Rimelia cetrata*, *R. reticulata*, *Roccella decipiens* e *Umbilicaria mammulata*) foram estudadas. Exceto líquens dos gêneros *Roccella*, *Leptogium* e *Dictyonema* que apresentam a alga *Trentepohlia* ou cianobactérias dos gêneros *Nostoc* e *Scytonema*, respectivamente, como fotobiontes, os demais contêm algas dos gêneros *Trebouxia* ou *Asterochloris*, sendo estes os mais estudados. A partir dos talos destes líquens, foram isoladas glucanas, xilanas, mananas, galactomananas, galactoglucomananas, galactomanoglucanas e um heteropolissacarídeo ácido. Os homopolímeros encontrados correspondem a uma α -D-glucana contendo ligações glicosídicas alternadas do tipo (1 \rightarrow 3)- e (1 \rightarrow 4) (1:1; nigerana), β -D-glucana contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 3)- e (1 \rightarrow 4) (1:3.1; liquenana), α -glucana (1 \rightarrow 3) (pseudonigerana), β -glucana (1 \rightarrow 3) (laminarana), β -glucana (1 \rightarrow 6) (pustulana) podendo conter grupamentos *O*-acetil, β -D-xilana linear ligada (1 \rightarrow 4) e uma β -D-manana linear contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 6). As galactomanoglucanas isoladas apresentaram cadeia principal contendo unidades de β -D-Glcp ligadas (1 \rightarrow 3) e especialmente substituídas em O-2,6 por cadeias laterais contendo unidades de Galf e Manp. Por outro lado, as galactoglucomananas e a maioria das galactomananas apresentaram uma cadeia principal composta por unidades de α -D-Manp contendo ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 6), as quais encontram-se principalmente substituídas em O-2, O-4 e/ou O-2,4 por diferentes cadeias laterais. Além dos polissacarídeos clássicos observados em líquens, foi ainda caracterizada uma galactomanana, obtida de *L. azureum*, altamente substituída em O-2 por terminais não redutores de α -D-Manp e/ou β -D-Galp. As unidades de β -D-Galp substituem as unidades de α -D-Manp da cadeia principal em O-4 e não em O-2, como geralmente observado. Além destes, foram ainda isolados polissacarídeos contendo estruturas ainda não descritas em líquens, como galactomananas altamente ramificadas de *R. decipiens*, apresentando uma cadeia principal composta por unidades de α -Manp (1 \rightarrow 4) ligadas, parcialmente substituídas em O-2 por cadeias laterais de unidades de α -Manp (1 \rightarrow 2) e (1 \rightarrow 6)-ligadas. As duas galactomananas apresentaram conteúdo variável de Galf. Uma das estruturas apresentou as unidades de Galf como terminais não-redutores, substituindo as unidades de Manp das cadeias laterais em O-6, enquanto que, a outra estrutura apresentou uma maior proporção de unidades de Galf como 5-*O*-, 6-*O*- e 5,6-di-*O*-substituídas. Uma β -D-manana linear contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 6) e uma pseudonigerana foram caracterizadas de *D. glabratum*. Os líquens do gênero *Leptogium* apresentaram polissacarídeos com características não usuais, como a presença das unidades de 3-*O*-Me-Galp e de altos teores de grupamentos ácidos. Os dados obtidos reforçam a utilização dos polissacarídeos como marcadores quimiotaxonômicos e sugerem um possível envolvimento do fotobionte na biossíntese de polissacarídeos liquênicos, uma vez que estruturas não descritas anteriormente foram encontradas em líquens que apresentam as algas *Trentepohlia*, *Nostoc* e *Scytonema* como fotobiontes.

ABSTRACT

The structures of polysaccharides from 15 species of lichenized fungi (*Cladina arbuscula*, *C. confusa*, *C. substenius*, *Dictyonema glabratum*, *Leptogium azureum*, *Leptogium* sp., *Parmotrema austrosinense*, *P. delicatulum*, *P. schindlerii*, *P. mantiqueirensense*, *P. tinctorum*, *Rimelia cetrata*, *R. reticulata*, *Roccella decipiens*, and *Umbilicaria mammulata*) were studied. Except for lichens of the genera *Roccella*, *Leptogium*, and *Dictyonema* that contain the algae *Trentepohlia*, *Nostoc* and *Scytonema* as photobionts, the other genera have algae from the well-studied genera *Trebouxia* and *Asterochloris*. Glucans, xylans, mannans, galactomannans, galactoglucomannans, galactomannoglucans, and an acidic heteropolysaccharide were isolated from the thalli of the lichens. Characterized homopolymers were an α -D-glucan, with alternate (1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 4)-linkages (1:1; nigeran), a β -D-glucan with (1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 4)-linkages (1:3.1; lichenan), a (1 \rightarrow 3)-linked α -glucan (pseudonigeran), a (1 \rightarrow 3)-linked β -glucan (laminaran), a (1 \rightarrow 6)-linked β -glucan (pustulan) with possible *O*-acetyl groups, a linear (1 \rightarrow 4)-linked β -D-xylan and a (1 \rightarrow 6)-linked β -D-mannan. The isolated galactomannoglucans contained a main chain of (1 \rightarrow 3)-linked β -D-Glcp units, substituted at O-2,6 by side chains of Galf and Manp units. In contrast, the galactoglucomannans and most of the galactomannans had a main chain of (1 \rightarrow 6)-linked α -D-Manp units, mainly substituted at O-2, O-4 and/or O-2,4 by various side chains. In addition to well-known lichen polysaccharides, some unusual ones were also characterized, such as a galactomannan from *L. azureum*, highly substituted at O-2 by non-reducing end units of α -D-Manp and/or β -D-Galp. β -D-Galp units substituted the α -D-Manp units of the main chain at O-4 and not at O-2, as usually observed. Also found were two highly substituted galactomannans from *R. decipiens* that have not been previously observed. The main chain of these polymers is composed of (1 \rightarrow 4)-linked α -Manp units, partially substituted at O-2 by (1 \rightarrow 2) and (1 \rightarrow 6)-linked α -Manp side-chains. These galactomannans had different contents of Galf units. One of them had Galf units as non-reducing ends, which substituted Manp units of the side chains at O-6, while the other contained a higher proportion of Galf units as 5-*O*-, 6-*O*- e 5,6-di-*O*- substituted units. A linear (1 \rightarrow 6)-linked β -D-mannan and pseudonigeran were also found in *D. glabratum*. Lichens from the genus *Leptogium* contained unusual polysaccharides, containing 3-*O*-methyl-galactopyranose units and high percentage of acidic groups. The data reinforce the use of polysaccharides as a chemotaxonomic tool and suggest an involvement of lichen photobionts in the biosynthesis of polysaccharides since new structures were found in lichens that have the algae *Trentepohlia*, *Nostoc* and *Scytonema* as photobionts.

1 INTRODUÇÃO

1.1 LIQUENS

1.1.1 Histórico

O nome líquen (do grego lie'ken) surgiu por volta do ano 300 a.C. quando Teofrastus, o Pai da Botânica, sentiu necessidade de atribuir um nome às “excrecências” encontradas nos troncos das oliveiras, muitas das quais eram o que atualmente se conceitua como líquen (MARCELLI, 1995).

Entretanto, apenas em 1868 foi reconhecida a verdadeira natureza dos liquens, quando o biólogo suíço Schwendener demonstrou tratar-se, não de um organismo vegetal, mas de uma simbiose complexa de alga e fungo. No entanto, a idéia inicial de simbiose fungo-alga, não foi aceita por todos. Botânicos como Bornet, Bonnier e Warning, inclinaram-se a considerar, nos liquens, a existência de um parasitismo do tipo que Warning denominou helotismo: a alga seria parasitada pelo fungo, que dela retiraria seu alimento. Outros como Beijerinck (1890), admitiram parasitismo, considerando a alga como parasita do fungo (XAVIER-FILHO e RIZZINI, 1976).

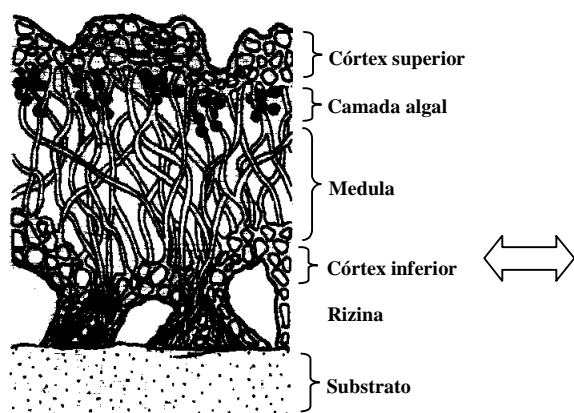
Numerosas teorias foram propostas e as explicações se sucederam através dos tempos. Atualmente, os liquens podem ser compreendidos como o resultado da associação simbiótica entre alga e fungo, o que permite a formação de uma estrutura específica, denominada talo liquênico (GARGAS et al., 1995), morfológicamente diferente da estrutura adquirida pela alga ou fungo quando em vida livre (HALE, 1979).

Embora a literatura clássica inclua os liquens na divisão dos criptógamos, admitindo uma relação filogenética com algas pluricelulares, musgos e pteridófitas, há uma grande controvérsia quanto à sua classificação, em níveis taxonômicos superiores (MARCELLI, 1995). Alguns liquenólogos discutem a classificação atual dos liquens e preferem referir-se a estes organismos como fungos liquenizados, devido a predominância do micobionte dentro da associação simbiótica (BARINAGA, 1995) e

pela ausência de evidências de um ancestral comum entre os fungos formadores de líquens (GARGAS et al., 1995). A sistemática atual dos fungos liquenizados quanto à ordem, família, gênero e espécie baseia-se, principalmente, na análise e descrição de caracteres morfológicos do talo liquênico e dos apotécios (MARCELLI, 1995; NASH, 1996). Contudo, a pesquisa de algumas substâncias químicas características dos líquens também tem sido utilizada como ferramenta da sistemática (MARCELLI, 1995), o que tem despertado grande interesse no desenvolvimento de pesquisas nesta área com o objetivo de isolar, purificar e caracterizar estruturalmente essas substâncias presentes neste tipo de organismo (GORIN et al., 1993).

1.1.2 Aspectos Gerais

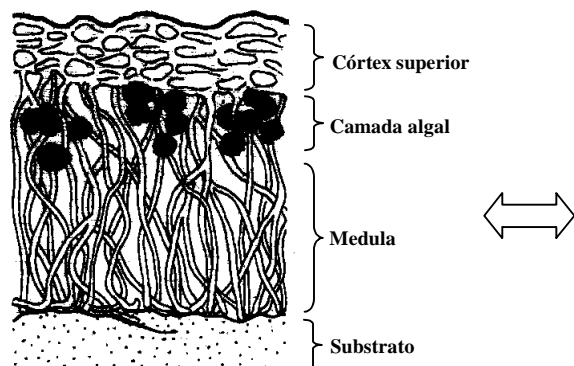
A simbiose liquênica é uma estratégia evolucionária bem sucedida, resultando em uma rica diversidade de espécies fúngicas (GRUBE; KROKEN, 2000). A significativa diversidade de espécies ilustra-se basicamente por três tipos de talos: folioso, fruticoso e crustoso (AHMADJIAN, 1993; NASH, 1996) (Figura 1).



FOLIOSO



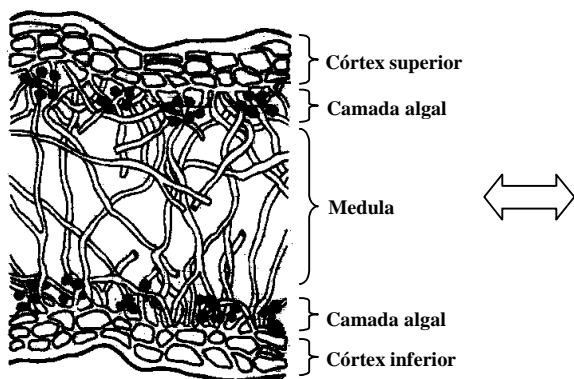
Xanthoria polycarpa



CRUSTOSO



Diploicia canescens



FRUTICOSO



Usnea subfloridana

FIGURA 1 – Tipos de talos liquênicos: folioso (ex: *Xanthoria polycarpa*), crustoso (ex: *Diploicia canescens*) e fruticoso (ex: *Usnea subfloridana*) (PRITCHARD; BRADT, 1984).

Os biontes liquênicos associados formam um talo íntegro no qual a alga e/ ou a cianobactéria (fotobionte) estão localizadas extracelularmente à hifa fúngica (micobionte) (SMITH, D.C., 1992). A biomassa liquênica é composta, principalmente, por hifas fúngicas que, em espécies mais complexas, desenvolvem-se em estruturas com caráter anatômico e morfológico altamente especializadas. A respeito das características morfológicas, as células fotobióticas são sempre envolvidas por hifas e localizam-se próximo à superfície inferior e acima do córtex fúngico. Desta forma, os líquens apresentam uma organização interna que mimetiza as folhas de plantas superiores, nas quais a absorção de luz pode ser maximizada (HONEGGER, 1993).

A constituição do talo liquênico compreende algas microscópicas semelhantes às mesmas espécies de vida livre e filamentos fúngicos (hifas), desenvolvendo-se simbioticamente (HALE, 1979; PURVIS, 2000). Um tecido resistente periférico, denominado córtex, protege as células fotobiontes do ressecamento e luz excessiva, enquanto outro mais interno, chamado medula, é frouxamente entrelaçado, facilitando as trocas gasosas (Figura 2).

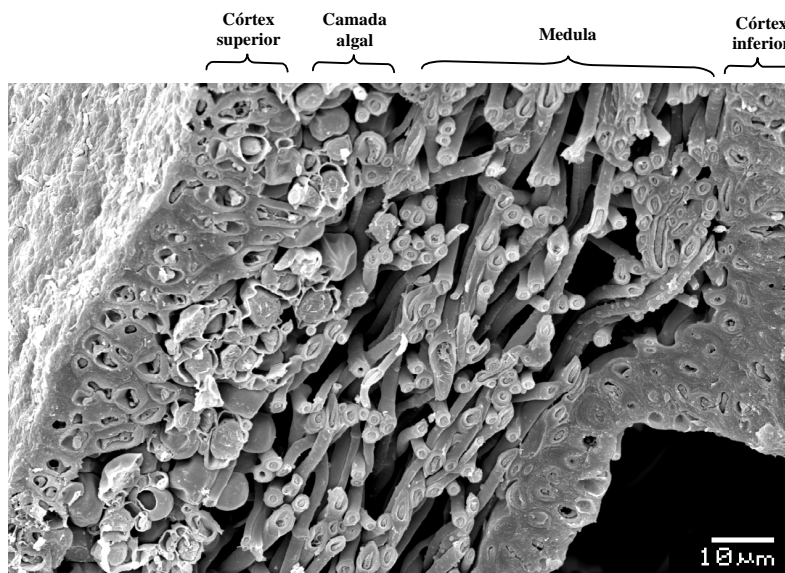


FIGURA 2 - Corte transversal de *Canomaculina pilosa* (Stiz.) Elix & Hale em eletromicrografia de varredura (cedida pela Profa. Dra. Sionara Eliasaro, Departamento de Botânica- UFPR). Aumento de 1000 x.

A respeito do micobionte, faz-se necessário salientar a diversidade destes organismos, sendo conhecidos 13.500 espécies de fungos liquenizados, dentre os quais 98% são ascomicetos (GALUN, 1988; HONEGGER, 1993, 1995, 1996; GARGAS et al., 1995). De acordo com HAWKSWORTH e HILL (1984), mesmo que os fungos liquenizados apresentem-se morfológica e anatomicamente mais complexos que os fungos não liquenizados, não há diferenças fundamentais entre estes organismos e não há indicações de crescimento diferenciado dentre estas hifas fúngicas (HONEGGER, 1993).

Já em relação aos componentes fotobiontes da simbiose liquênica, dentre os 1600 gêneros conhecidos de algas (GALUN, 1988), apenas 40 tem sido reportado como fotobiontes em líquens (TSCHERMACK-WOESS, 1988; BÜDEL, 1992). A maioria (90%) dos fotobiontes são algas verdes (Chlorophyta), sendo os gêneros *Trebouxia* e *Trentepohlia* os mais freqüentes. *Nostoc* é o gênero mais comum de cianobactérias e é capaz de fixar tanto CO₂ quanto N₂. Dentre a grande diversidade de fungos liquenizados, em aproximadamente 500 espécies de líquens ocorre a presença de dois fotobiontes associados a um único fungo, sendo uma alga verde o bionte fotossintético primário e uma cianobactéria o membro fotossintetizante secundário, fixador de N₂ (TSCHERMACK-WOESS, 1988). Este último é particularmente complexo e encontra-se nos cefalódios, regiões de crescimento do talo liquênico (MARCELLI, 1995; PURVIS, 2000). Nesta simbiose, tem-se então a contribuição da alga na produção de açúcares através da fotossíntese e, no caso das cianofíceas, a elaboração de aminoácidos a partir de gás carbônico e nitrogênio, em associação com a água. (GOLA et al., 1965).

Os líquens são principalmente rupícolas e epífitas, mas algumas espécies desenvolvem-se diretamente sobre o solo. São elementos importantes na desagregação das rochas devido à eliminação de certos ácidos orgânicos (ácidos liquênicos), os quais reagem com elementos minerais da superfície (JOLY, 1975). Além disso, algumas espécies que fixam o nitrogênio atmosférico, ou seja, aquelas nas quais o ficobionte é uma cianofícea, são comuns e valiosas para vários ecossistemas (AHMADJIAN, 1993; PURVIS, 2000).

De distribuição cosmopolita, os líquens são especialmente diversificados nas regiões tropicais e em áreas polares, podendo constituir o único tipo de vegetação, indicando uma grande adaptação a condições ambientais adversas. A excepcional resistência a variações de temperatura é uma característica inerente a esses organismos (XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976). Os líquens com fotobiontes verdes podem ser metabolicamente reativados quando são expostos somente ao vapor de água. Ao contrário, os cianolíquens precisam de água para reativar seu metabolismo. Os líquens perdem rapidamente compostos inorgânicos e orgânicos após serem re-hidratados. Fotobiontes verdes têm meios de proteger seus sistemas fotossintéticos de repetidos ressecamentos e luz excessiva (AHMADJIAN, 1993).

Muitos líquens vêm sendo utilizados como medicamentos, bases fixadoras de perfumes, corantes, fontes de alimento (RAVEN, 1996; PURVIS, 2000), ou ainda, como indicadores de poluição ambiental devida a sua sensibilidade a SO₂, NO₂ e ozônio e habilidade em absorver e acumular metais pesados (HAWKSWORTH, 1984; PURVIS, 2000).

1.2 PRINCIPAIS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS LIQUENS

Entre os principais constituintes químicos encontrados nos líquens incluem as substâncias liquênicas, os carotenóides e carboidratos de baixa e alta massa molar.

1.2.1 Substâncias Liquênicas

Substâncias liquênicas, conhecidas como ácidos liquênicos, são produtos do metabolismo secundário do micobionte (produzidos pela hifa), sendo depositados no córtex e ou medula, em concentração de 0,1 a 10% em relação ao peso do líquen seco, embora em alguns casos a concentração possa ser superior (HALE, 1983).

Cerca de 630 compostos, provenientes do metabolismo secundário de líquens, são conhecidos. Dentre estes, estão os ácidos alifáticos *meta* e *para* – depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico. Ainda que alguns destes compostos

sejam produzidos por fungos de vida livre e por plantas superiores, a maior parte é considerada exclusiva de líquens (ELIX, 1996). Devido à capacidade de reagirem com substâncias químicas específicas, produzindo na maioria das vezes reações coloridas, e a sua grande especificidade de ocorrência nos líquens, estas substâncias vem sendo utilizadas com propósitos taxonômicos. Elas são estudadas rotineiramente pelos sistematistas, através de cromatografia de camada delgada, sendo para vários grupos (por ex. Parmeliaceae e Cladoniaceae) essenciais para a identificação das espécies (HONDA; VILEGAS, 1998).

Embora muitas destas substâncias líquênicas sejam conhecidas, o seu papel ainda não está bem definido. Porém, parece que estas estão envolvidas no mecanismo de proteção contra o ataque de animais e contra o desenvolvimento de bactérias, fungos e musgos. Além disso, algumas substâncias líquênicas, como os ácidos úsnicos, apresentam também atividade antiistamínica, espasmolítica e antiviral (VARTIA, 1973).

1.2.2 Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos secundários ou acessórios que absorvem luz, em comprimentos de onda diferentes da clorofila, que ocorrem regularmente em líquens. A ocorrência destes compostos nos talos líquênicos pode ser influenciada por fatores ambientais como clima, altitude, latitude e principalmente, a intensidade da luz ambiental (CZECZUGA; XAVIER-FILHO, 1987; CZECUZA; SKULT, 1998).

Seu papel em líquens não é bem conhecido, porém, parece estar envolvido na proteção do líquen contra luminosidade excessiva e também na foto e termo-proteção evitando a dissipação de energia (ADAM et al., 1993).

1.2.3 Carboidratos de Baixa Massa Molar

Relativamente, poucos estudos têm sido realizados a cerca da distribuição destes carboidratos de baixa massa molar em diferentes espécies de líquens (NISHIKAWA et al., 1973). A investigação mais abrangente foi realizada por

LINDBERG e colaboradores (1953) em 60 espécies de líquens. Eles pesquisaram a presença de polióis arabinitol, manitol, e volemitol e de dissacarídeos.

Nesta classe de carboidratos encontram-se os monossacarídeos redutores (pentoses, metilpentoses, hexoses e cetoses), polióis (com moléculas contendo entre 3 a 7 átomos de carbono) e os oligossacarídeos (GORIN et al., 1993).

1.2.4 Carboidratos de Alta Massa Molar

O primeiro relato descrevendo a presença de polissacarídeos em líquens foi realizado por Berzelius, em 1815. Examinando o líquen *Cetraria islandica*, ele isolou um polissacarídeo insolúvel em água, conhecido por liquenina (BERZELIUS¹, citado por GORIN et al., 1993). Posteriormente, verificou-se que este era constituído por unidades de glucose, com rotação óptica específica de +18°, compatível com a configuração β . Através de análises de metilação e oxidação com metaperiodato de sódio, determinou-se que a estrutura era composta por ligações (1→3) e (1→4) na proporção de 3:7 (MEYER; GÜRTLER, 1947).

Durante o processo de purificação da liquenana (= liquenina) foi observado a presença de uma glucana solúvel em água. Utilizando-se de processos analíticos e quantitativos, o polissacarídeo foi identificado como sendo uma α -D-glucana linear composta por ligações (1→3), (1→4). Através da degradação controlada de Smith foi possível elucidar a distribuição destas ligações ao longo da cadeia da glucana, que indicou ser uma estrutura repetitiva preponderante com duas ligações (1→3) consecutivas interceptadas por uma ligação (1→4) isolada (43%), embora uma sequência de ligações (1→3) e (1→4) alternadas estivesse amplamente distribuídos (38%) além de uma menor proporção de ligações (1→4) adjacentes (6%), sendo denominada isoliquenana (CHANDA et al., 1957).

¹ BERZELIUS, J.J. Versuche über die Mischung des Isländischen Mosses und Seine Anwendung als Nahrungsmittel. **J. Chem. Phys.**, v. 7, p. 317-353, 1815.

A partir destes estudos com a *Cetraria islandica*, em que foram isolados os polissacarídeos liquenana e isoliquenana, muitos outros trabalhos sucederam com o objetivo de obtenção de polissacarídeos de diferentes espécies de líquens.

Dentre os polissacarídeos caracterizados, as glucanas são os homopolímeros comumente encontrados. Na Tabela 1 está ilustrado as estruturas de glucanas atualmente conhecidas. Pode-se verificar que a maioria destas apresenta estruturas lineares com diferentes tipos de ligações, sendo pertencentes a série alfa (α) ou beta (β). De acordo com o tipo de ligação e a proporção das ligações as glucanas recebem denominações específicas (nigerana, isoliquenana, pustulana, entre outras).

TABELA 1 – Tipos de glucanas encontradas em fungos liquenizados

Tipos de glucanas	Denominação	Proporção das ligações	Características estruturais
α -D-Glucana (1→3), (1→4)	Nigerana	1:1	Linear; algumas possuem ligações (1→2)
		1.2:1	Linear
	Isoliquenana	3:1	Linear, distribuição irregular de ligações
		3.8:1	Apresenta ramificação em O-2 (5%)
		4:1	Linear
		6:1	Possuem ligações (1→6)
	Acroscifana	2:3	Possuem ligações (1→6) (~ 6%)
		2:5	Apresenta ramificação em O-3 (3%)
α -D-Glucana (1→4), (1→6)	Pululana	1:1	Linear
β -D-Glucana (1→3)	Laminarana		Linear
β -D-Glucana (1→6)	Pustulana		Podem apresentar grupamentos O-acetil
β -D-Glucana (1→3), (1→4)	Liquenana	1:2	Linear
		1:3	Linear
		3:1	Linear
		3:7	Linear
β -D-Glucana (1→3), (1→6)			Apresentam cadeia principal formada por unidades de β -D-Glcp (1→3), (1→6) ou cadeia principal formada apenas por unidades de β -D-Glcp (1→3) ligadas; Contém altos teores de ramificação em O-6 (~ 20%)

Além da intensiva pesquisa com as glucanas presentes nos fungos liquenizados, houve também um grande interesse em analisar heteropolissacarídeos nestes tipos de organismos.

Os primeiros estudos foram realizados em 1906, por ULANDER e TOLLENS², citado por GORIN et al. (1993), quando detectaram manose, galactose e glucose no líquen *Cetraria islandica*. Deste estudo, seguido por outros, foi deduzido que o referido líquen apresentava, além da glucana, um heteropolissacarídeo provavelmente constituído por manose e galactose. Mas, devido à utilização de processos de purificação inadequados e de métodos analíticos rudimentares não foi possível elucidar a estrutura química do referido polissacarídeo. Apenas em 1984, com os trabalhos de GORIN, IACOMINI e colaboradores (GORIN; IACOMINI, 1984, 1985; IACOMINI et al., 1985) que as estruturas químicas de galactomananas isoladas de líquens foram devidamente elucidadas, através de procedimentos de purificação mais adequados e principalmente de técnicas analíticas mais modernas, por exemplo, espectroscopia de ressonância nuclear magnética de carbono treze (RMN-¹³C) e a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

O heteropolímero de *Cetraria islandica* foi o primeiro heteropolissacarídeo estudado por estes autores, que mostrou ser uma galactomanana constituída por uma cadeia principal composta de unidades de α -D-manopiranosose unidas por ligações (1→6) e com cadeias laterais de α -D-galactopiranosose e de β -D-galactopiranosose ligados (1→2) e (1→4), respectivamente (GORIN; IACOMINI, 1984).

Os dados referentes aos heteropolissacarídeos presentes na literatura até a presente data são mostrados, de maneira geral, na Tabela 2. Foram observados diferentes tipos de estruturas, sendo as galactomananas e as galactoglucomananas as mais comumente encontradas, que apresentam uma cadeia principal formada por unidades de α -Manp-(1→6) substituídas, principalmente, em O-2, O-4 e/ou O-2,4 por unidades de α - ou β - Galp ou α -Manp ou Glcp e, mais raramente, por β -Galf (Figura 3).

² ULANDER, A.; TOLLENS, B. Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Flechten. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 39, p. 401, 1906

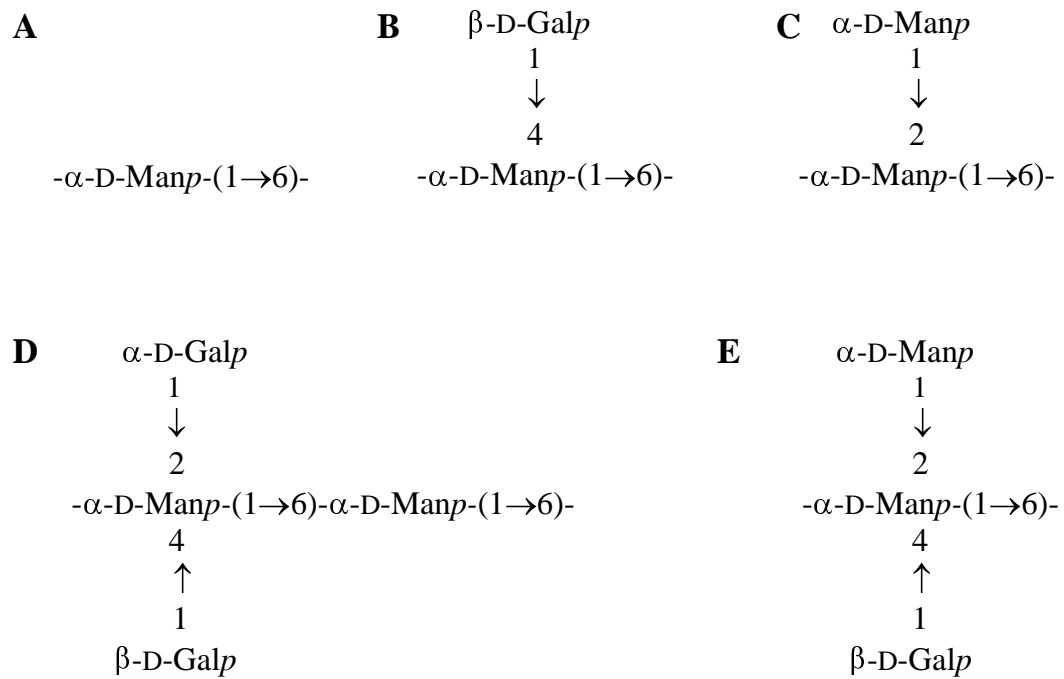


FIGURA 3 - Principais estruturas observadas em galactomananas obtidas de líquens

TABELA 2 – Tipos de heteropolissacarídeos encontrados em fungos liquenizados

Heteropolissacarídeos	Composição Monossacarídica	Cadeia principal	Principais características estruturais
Galactomananas e/ou Galactoglucomananas	Man:Gal:Glc com proporções variáveis, sendo Man e Gal sempre em maior proporção	α -D-Manp (1→6)	Apresentam diferentes padrões de substituição principalmente em O-2, O-4 e/ou O-2,4 por unidades de α - ou β -Galp ou α -Manp ou Glcp, mais raramente por β -Galf.
Glucomanana	Man:Gal:Glc (93:00:07)	α -D-Manp (1→6)	Substituída, principalmente, em O-2 por cadeias laterais de α -D-Manp e menor proporção de α -D-Glcp
Xilomanana	Gal:Rha:Glc:Xyl:Man:Fuc (17:04:08:32:29:10)	α -D-Manp (1→3)	não substituídas (10%) ou 4-O- (10%) e 2,4-di-O-substituídas (10%) por unidades de β -D-Xylp
Galactomanoglucanas	Glc: Gal: Man com proporções variáveis	β -D-Glcp (1→3)	Substituídas, principalmente, em O-2 e O-6 sob diferentes modelos por unidades D-Manp e D-Galp substituídas e ainda unidades de D-Galf terminal não redutora
Arabinogalactomanoglucana	Ara:Gal:Man:Glc 12:34:40:14	β -D-Glcp (1→3)	Apresentam substituição em O-2 e O-6 por cadeias laterais altamente ramificadas
Ramnogalactofuranana (Thamnolana)	Gal:Rha:Glc:Xyl:Man 40:31:13:10:06	β -D-Galf-(1→3)	Apresenta substituição em O-6 por diferentes tipos de cadeias laterais

Recentemente, tem sido descritas estruturas de galactomananas contendo cadeias laterais altamente complexas. Moléculas deste tipo foram isoladas de *Lasallia pustulata*, a qual apresentou uma cadeia principal formada por unidades de α -D-Manp-(1→6), parcialmente substituídas por Galf e/ou por cadeias laterais de α -D-Manp-(1→2), de diferentes tamanhos (Figura 4) (PEREYRA et al., 2003).

TABELA 3 – POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE FUNGOS LIQUENIZADOS

Família Gênero /espécies	Tipo de Glucanas		Heteropolissacarídeos contendo manose (Man:Gal:Glc)	Referências
	β-D-Glucana	α-D-Glucana		
Alectoriaceae				
<i>Alectoria sulcata</i>	Liquenana	Isoliquenana		TAKEDA et al., 1972.
<i>A sarmentosa</i>	Liquenana	Isoliquenana		TAKEDA et al., 1972.
Caliaciaceae				
<i>Acroscyphus sphaerophoroides</i>		Acroscifana (2:3) ⁽¹⁾		YOKOTA; SHIBATA; SAITÔ, 1979.
Cladoniaceae				
<i>Cladonia alpestris</i>		Nigerana (1:1)	66:24:09 ⁽²⁾	IACOMINI; SCHNEIDER; GORIN, 1985.
<i>C. amaurocraea</i>	Pustulana		50:29:20 ⁽²⁾	IACOMINI; SCHNEIDER; GORIN, 1985.
<i>C. bellidiflora</i>	Laminarana	Nigerana (1:1)		CARBONERO et al., 2001; SHIBATA, 1973.
<i>C. boryi</i>	Laminarana			CARBONERO et al., 2001.
<i>C. clathrata</i>	Laminarana	Nigerana (1:1)	46:41:10 ⁽³⁾ / 55:34:10 ⁽⁴⁾	CARBONERO et al., 2001; WORANOVICZ-BARREIRA, 1999a,b.
<i>C. confusa</i>		Nigerana (1:1)	33: 63:04 ⁽²⁾	IACOMINI; SCHNEIDER; GORIN, 1985.
<i>C. connexa</i>	Laminarana	Nigerana (1:1)	47: 40:11 ⁽³⁾ / 55:38:05 ⁽⁴⁾	CARBONERO et al., 2001; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a,b.
<i>C. crispata</i>		Nigerana (1:1)		NISHIKAWA et al., 1974
<i>C. crispatula</i>	Laminarana	Nigerana (1:1)	38:44:15 ⁽³⁾ / 63:29:07 ⁽⁴⁾	CARBONERO et al., 2001; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a,b.
<i>C. furcata</i>	Laminarana	Nigerana (1:1)	55:42:03 ⁽⁴⁾	CARBONERO et al., 2001; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a,b.
		Isoliquenana (3:1)		
<i>C. gracilis</i>	Laminarana			CARBONERO et al., 2001
<i>C. ibitipocae</i>	Laminarana	Nigerana (1:1)	46:41:10 ⁽³⁾ / 40:47:10 ⁽⁴⁾	CARBONERO et al., 2001; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a,b,c.
<i>C. imperialis</i>	Laminarana	Nigerana (1:1)		CARBONERO et al., 2001; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a,b.
<i>C. miniata</i>	Laminarana	Nigerana (1:1)	48:40:10 ⁽³⁾ / 65:21:12 ⁽⁴⁾	CARBONERO et al., 2001; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a,b,d.
<i>C. mitis</i>		Nigerana (1:1)		NISHIKAWA et al., 1974
<i>C. pacifica</i>		Nigerana (1:1)		SHIBATA, 1973
<i>C. penicillata</i>	Laminarana	Nigerana (1:1)	39: 43:16 ⁽³⁾ / 60:38:02 ⁽⁴⁾	CARBONERO et al., 2001; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a,b.
<i>C. rangiferina</i>		Nigerana (1:1)		NISHIKAWA et al., 1974
<i>C. salmonea</i>	Laminarana	Nigerana (1:1)	43:47:10 ⁽³⁾ / 62:28:10 ⁽⁴⁾	CARBONERO et al., 2001; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a,b,d.
<i>C. signata</i>	Laminarana	Nigerana (1:1)	48:37:13 ⁽³⁾ / 57:39:04 ⁽⁴⁾	CARBONERO et al., 2001; WORANOVICZ-BARREIRA, 1999a
<i>C. squamosa</i>		Nigerana (1:1)		NISHIKAWA et al., 1974
<i>C. substellata</i>	Laminarana		40:49:10 ⁽³⁾ / 59:27:12 ⁽⁴⁾	CARBONERO et al., 2001; WORANOVICZ-BARREIRA, 1999b,c.
<i>C. uncialis</i>	Laminarana			CARBONERO et al., 2001
<i>Cladia aggregata</i>			50:42:04 ⁽²⁾	WORANOVICZ, 1995.

TABELA 3 – POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE FUNGOS LIQUENIZADOS

(continuação)

Família Gênero /espécies	Tipo de Glucanas		Heteropolissacarídeos contendo manose (Man:Gal:Glc)	Referências
	β-D-Glucana	α-D-Glucana		
Collemataceae				
<i>Collema leptosporum</i>	(1→3) (1→6) ⁽⁵⁾		82:18:00 ⁽²⁾	PRADO et al., 1999.
Dictyonemataceae				
<i>Cora pavonia</i> ⁽⁶⁾ (=Dictyonema glabratum)	(1→3) (1→6) ⁽⁷⁾			IACOMINI et al., 1987.
Lobariaceae				
<i>Pilophoron ocularis</i>		Isoliquenana (2:1)		YOKOTA; SHIBATA; SAITÔ, 1979.
<i>Pseudocyphellaria aurata</i>			61:30:19 ⁽⁴⁾	TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992.
<i>P. clathrata</i> ⁽⁸⁾			70:23:7 ⁽⁴⁾	CORDEIRO et al., 2004.
<i>Sticta sp.</i>			63:21:16	CORRADI da SILVA et al., 1993.
Parmeliaceae				
<i>Cetraria cucullata</i>	Liquenana (1:2)	Isoliquenana (2:1)	55:35:10	GORSHKOVA et al., 1997.
<i>Cetraria islandica</i> ⁽⁹⁾	Liquenana (3:7)	Isoliquenana (3:2) e (2:1)	43:44:17 ⁽²⁾	MEYER; GÜRTLER, 1947a,b; FLEMING; MANNERS, 1966; GORIN; IACOMINI, 1984; INGOLFSDOTTIR et al., 1994; OLAFSDOTTIR et al., 1999.
<i>C. nivaris</i>	Liquenana	Isoliquenana		MITTAL; NEELAKANTAN; SESHADRI, 1952.
<i>C. richardsonii</i>	Liquenana (3:7)	Isoliquenana (3:2)		YOKOTA; SHIBATA; SAITÔ, 1979
<i>Evernia prunastri</i>	Liquenana (3:1)	Isoliquenana (4:1) e (3:2) Isoliquenana (6:1) ⁽¹⁰⁾ Nigerana (1:1) ⁽¹¹⁾	49:42:09 ⁽²⁾	TAKEDA et al., 1972; TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992; HRANISAVLJEVIC-JAKOVLJEVIC et al., 1975
<i>Flavoparmelia caperata</i> (=Parmelia caperata)		Isoliquenana (3:2) Nigerana (1:1)		NISHIKAWA et al., 1974; TAKEDA; NISHIKAWA; SHIBATA, 1970; SMRIGA et al., 1996.
<i>Letharia vulpina</i>	Liquenana (1:3)	Nigerana (1,2: 1)	41:28:31 ⁽²⁾	IACOMINI et al., 1988; GORIN; IACOMINI, 1985.
<i>Newropogon aurantiaco- ater</i>	Liquenana (2:1)	Isoliquenana (3:2)	45:55 ⁽²⁾	BARON et al., 1991.
<i>P. cetrarioides</i>		Isoliquenana Nigerana (1:1)		SHIBATA, 1973.
<i>P. conspersa</i>	Liquenana	Isoliquenana		SHIBATA, 1973.
<i>P. hypotrypella</i>	Liquenana	Isoliquenana		SHIBATA, 1973.
<i>P. laevior</i>		Isoliquenana Nigerana (1:1)		SHIBATA, 1973.

TABELA 3 – POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE FUNGOS LIQUENIZADOS

(continuação)

Família Gênero /espécies	Tipo de Glucanas		Heteropolissacarídeos contendo manose (Man:Gal:Glc)	Referencias
	β-D-Glucana	α-D-Glucana		
<i>P. nikkoensis</i>	Liquenana	Isoliquenana		SHIBATA, 1973.
<i>P. saxatilis</i>		Isoliquenana (2:1) Nigerana (1,3:1)		OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDDOTTIR, 2001.
<i>P. tinctorum</i>	Liquenana	Isoliquenana		SHIBATA, 1973.
<i>Parmotrema cetratum</i> (=Rimelia cetrata)	Liquenana (1:1,19)		47:44:09 ⁽⁴⁾	CORRADI da SILVA ; GORIN; IACOMINI, 1993.
<i>P. araucaria</i>			50:44:06 ⁽²⁾ / 49:44:07 ⁽²⁾	TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992.
<i>P. sulcata</i>			49:40:10 ⁽²⁾	GORIN; IACOMINI, 1985.
<i>Usnea barbata</i>	Liquenana	Isoliquenana		MITTAL; NEELAKANTAN; SESHADRI, 1952.
<i>U. baylei</i>	Liquenana	Isoliquenana		SHIBATA, 1973; NISHIKAWA et al., 1969.
<i>U. fasciata</i>		Isoliquenana		PEREIRA et al., 1994.
<i>U. longissima</i>	Liquenana	Isoliquenana		MITTAL; SESHADRI, 1954.
<i>U. meridionalis</i>			35:42:23 / 52:35:13	TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992.
<i>U. rubescens</i>	Liquenana (3:7)			NISHIKAWA et al., 1974.
<i>Usnea</i> sp.	Liquenana (1:3)		43:42:14 ⁽²⁾	GORIN; IACOMINI, 1985; IACOMINI et al., 1988.
Peltigeraceae				
<i>Peltigera aphthosa</i>			58:39:02 ⁽²⁾	GORIN; IACOMINI, 1985.
Pysciaceae				
<i>Tornabenia intricata</i>			93:00:09 ⁽¹²⁾	TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992.
Ramalinaceae				
<i>Ramalina celastri</i> (= <i>R. ecklonii</i>)	Laminarana	Isoliquenana (3:1) Nigerana (1:1)	46:54:00 ⁽²⁾	STUELP et al., 1999; MICENO; GORIN; IACOMINI, 1991.
<i>R. dendriscoides</i>	Laminarana	Isoliquenana (3:1) Nigerana (1:1)	57:33:10 ⁽²⁾	CORDEIRO et al., 2003a.
<i>R. fraxinea</i>	Laminarana	Isoliquenana (3:1) Nigerana (1:1)	55:39:06 ⁽²⁾	CORDEIRO et al., 2003a.
<i>R. gracilis</i>	Laminarana	Isoliquenana (3:1) Nigerana (1:1)	53:37:10 ⁽²⁾	CORDEIRO et al., 2003a.
<i>R. peruviana</i>	Laminarana	Isoliquenana (3:1) Nigerana (1:1)	51:44:05 ⁽²⁾	CORDEIRO et al., 2003a.
<i>R. usnea</i>	Laminarana	Isoliquenana (3,8:1) ⁽¹¹⁾	43:53:3 ⁽²⁾	GORIN; IACOMINI, 1984.
Roccellaceae				
<i>Roccella montagnei</i>	Liquenana	Isoliquenana		MITTAL; SESHADRI, 1954.

TABELA 3 – POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE FUNGOS LIQUENIZADOS

(conclusão)

Família Gênero /espécies	Tipo de Glucanas		Heteropolissacarídeos contendo manose (Man:Gal:Glc)	Referências
	β -D-Glcana	α -D-Glcana		
Stereocaulaceae				
<i>Stereocaulon exutum</i>		Isoliquenana (3:1)		TAKAHASHI et al., 1981.
<i>S. japonicum</i>		Isoliquenana (2:7) ⁽¹¹⁾ (2:1) (3:1)		YOKOTA; SHIBATA; SAITÔ, 1979; TAKAHASHI et al., 1981; YOKOTA; SHIBATA, 1978.
<i>S. paschale</i>		Acroscifana (2:5)	63:31:05 ⁽²⁾	HAUAN; KJØLBERG, 1971; GORIN; IACOMINI, 1985.
<i>S. ramulosum</i>	Laminarana	Isoliquena (1,6:1)	60:40:00 ⁽²⁾	BARON; GORIN; IACOMINI, 1988.
<i>S. sorediiferum</i>		Isoliquenana (3:1)		TAKAHASHI et al., 1981.
Sphaerophraceae				
<i>Sphaerophorus globosus</i>		Acroscifana (2:3) ⁽¹⁾		YOKOTA; SHIBATA; SAITÔ, 1979.
Teloschistaceae				
<i>Teloschistes flavicans</i>	(1→4) (1→6) (1:1)	(1→3) (1→6) ⁽¹³⁾		REIS et al., 2002.
Umbilicariaceae				
<i>Actinogyra muehlenbergii</i>	Pustulana ⁽¹⁴⁾		62:30:08 ⁽²⁾	GORIN; IACOMINI, 1985; IACOMINI et al., 1988.
<i>Gyrophora esculenta</i>	Pustulana ⁽¹⁴⁾			SHIBATA et al., 1968.
<i>Lasallia papulosa</i>	Pustulana ⁽¹⁴⁾			SHIBATA et al., 1968.
<i>Lasallia pustulata</i>	Pustulana ⁽¹⁴⁾ Laminarana		52:18:06 ⁽²⁾	PEREYRA et al., 2003.
<i>L. pensylvanica</i>	Pustulana ⁽¹⁴⁾			NISHIKAWA et al., 1974.
<i>Umbilicaria angulata</i>	Pustulana ⁽¹⁴⁾			NISHIKAWA et al., 1970.
<i>U. caroliniana</i>	Pustulana ⁽¹⁴⁾			NISHIKAWA et al., 1970.
<i>U. hirsuta</i>	Pustulana			SHIBATA et al., 1968; LINDBERG; McPHERSON, 1954.
<i>U. polyphylla</i>	Pustulana ⁽¹⁴⁾			NISHIKAWA et al., 1970.
<i>U. pustulata</i>	Pustulana		40:20:30	LINDBERG; McPHERSON, 1954; KJØLBERG; KVERNHEIM, 1989.
<i>U. spodochoa</i>			32:19:32	KJØLBERG; KVERNHEIM, 1989.
Líquen imperfeito				
<i>Thamnolia vermicularis</i> ⁽¹⁵⁾	(1→3) (1→6) ⁽¹⁶⁾			OLAFSDOTTIR et al., 2003.

(1) Contém 6% de ligações (1→6);

(2) Galactomanana [Cadeia principal formada por unidades de α -D-Manp (1→6)];(3) Galactomanoglucana [Cadeia principal formada por unidades de β -D-Glcp (1→3)];(4) Galactoglucomanana [Cadeia principal formada por unidades de α -D-Manp (1→6)];

(5) Apresenta ramificações em O-6 (23%);

(6) Contém um hetopolissacarídeo não-usual (xilomanana);

(7) Apresenta ramificações em O-6 (21%);

(8) Contém uma arabinogalactoglucomanana (Ara:Gal:Man:Glc) 12:34:40:14;

(9) Apresentou uma galactomanana contendo 4% de ramnose (57:39:04) (Man:Gal:Glc);

(10) Contém ligações (1→6);

(11) Contém ligações (1→2);

(12) Glucomanana [Cadeia principal formada por unidades de α -D-Manp (1→6)];

(13) Apresenta ramificações em O-6 (15%);

(14) Parcialmente O-acetilada;

(15) Possui uma ramnogalactofuranana denominada thamnolana;

(16) Glucana com cadeia principal de unidades de β -D-Glcp (1→3), substituídas em O-6.

1.3 IMPORTÂNCIA QUIMIOTAXONÔMICA DOS POLISSACARÍDEOS LIQUÊNICOS

A identificação e classificação dos fungos liquenizados foi originalmente realizada com base na morfologia. Desde 1860, a diferenciação das espécies foi auxiliada por reações coloridas específicas, apresentadas pelas substâncias liquênicas (AGHORAMURTH; SARMA; SESHADRI, 1961; PURVIS, 2000), ou, ainda por carotenóides (CZEZUGA; SKULT, 1988; CZEZUGA; XAVIER-FILHO, 1987). Com relação a quimiotaxonomia, a identificação de líquens em gêneros e espécies vem sendo conduzida por reações de coloração no talo, microcristalização, análise cromatográfica, análise por fluorescência e espectrometria de massa de metabólitos secundários (HONDA; VILEGAS, 1998). Recentemente, os avanços das técnicas de biologia molecular em conjunto com a caracterização estrutural fina de macromoléculas, são uma importante ferramenta na classificação taxonômica de líquens, pois, na maioria das vezes, dados relativos apenas à análise morfológica não elucidam a identificação de um dado espécime (HONDA; VILEGAS, 1998).

Em termos de macromoléculas, o estudo de polissacarídeos como uma análise auxiliar na taxonomia é decorrente da diversidade estrutural tanto das glucanas quanto das galactomananas obtidas dos diferentes líquens. As estruturas destes polímeros, evidenciadas por análises químicas e espectroscópicas de RMN, mostram-se típicas e podem, portanto, serem utilizadas em estudos quimiotaxonômicos (GORIN; BARON; IACOMINI, 1988; GORIN et al., 1993; TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1995; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a,b,c).

Dados obtidos até a presente data (Tabela 3) sugerem que os polissacarídeos obtidos dos diferentes líquens apresentam um padrão de distribuição. Como pode ser observado, a pustulana é característica para a família Umbilicariaceae, liquenana é encontrado em Parmeliaceae, nigerana e laminarana são as glucanas presentes em Cladoniaceae, enquanto que nigerana, laminarana e isoliquenana são características em Ramalinaceae. Isto sugere que as glucanas desempenham um importante papel como marcadores taxonômicos para gênero e família. Assim como para as glucanas, os

heteropolissacarídeos também vêm sendo utilizados na classificação. Devido a complexidade estrutural, estes polímeros podem, em alguns casos, diferenciar entre gêneros e até mesmo entre espécies.

Dentre as 13.500 espécies de fungos liquenizados, não mais que 100 foram estudadas quanto aos polissacarídeos e entre estes a maioria apresenta como fotobionte a alga verde do gênero *Trebouxia*. Devido a poucos estudos realizados na área de química de carboidratos e a importância destes como marcadores quimiotaxonômicos, o presente estudo procura ampliar os conhecimentos para a classificação de fungos liquenizados.

1.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS LIQUENS ESTUDADOS

Na presente pesquisa, foram estudadas 15 espécies de fungos liquenizados quanto aos seus componentes polissacarídicos. Estes pertencem ao gênero *Cladina*, *Dictyonema*, *Leptogium*, *Parmotrema*, *Rimelia*, *Roccella* e *Umbilicaria* (Figuras 5A e 5B).



Cladina arbuscula



Cladina confusa



Cladina substenius



Dictyonema glabratum



Leptogium azureum



Leptogium sp.



Parmotrema austrosinense



Parmotrema delicatulum

FIGURA 5 A - Fragmentos dos líquens dos gêneros *Cladina* (*C. arbuscula*, *C. confusa*, *C. substenius*), *Dictyonema* (*D. glabratum*), *Leptogium* (*L. azureum*, *Leptogium sp.*), *Parmotrema* (*P. austrosinense* e *P. delicatulum*).



Parmotrema mantiqueirense



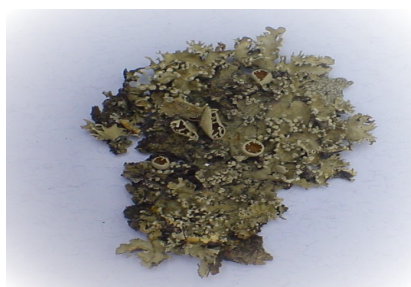
Parmotrema schindlerii



Parmotrema tinctorum



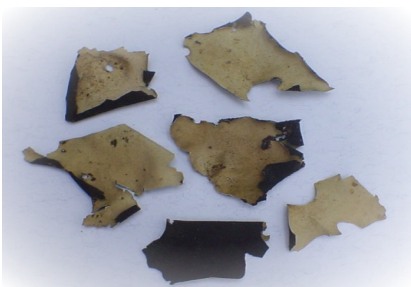
Rimelia cetrata



Rimelia reticulata



Roccella decipiens



Umbilicaria mammulata

FIGURA 5 B - Fragmentos dos líquens dos gêneros *Parmotrema* (*P. mantiqueirense*, *P. schindlerii* e *P. tinctorum*), *Rimelia* (*R. cetrata* e *R. reticulata*), *Roccella* (*R. decipiens*) e *Umbilicaria* (*U. mammulata*).

1.4.1 *Cladina* spp (Família Cladoniaceae)

Cladina é um gênero da classe Ascomycetes, ordem Lecanorales, família Cladoniaceae que tem despertado muita dúvida no meio científico quanto a sua classificação. Na América, Ásia, Austrália e Rússia. *Cladina* é reconhecida, como um gênero a parte, muito embora, na maior parte da Europa, diversos autores a reconhecem apenas como um subgênero do gênero *Cladonia* (STENROOS; AHTI, 1996). Atualmente, o mesmo foi novamente considerado como *Cladonia* (AHTI; DEPRIEST, 2001).

O fotobionte presente neste gênero de líquen é a alga verde *Asterochloris* sp. e a morfologia apresentada é do tipo fruticoso.

1.4.2 *Dictyonema glabratum* (Família Dictyonemataceae)

O líquen folioso *Dictyonema glabratum* (família Dictyonemataceae) é conhecido comumente no Brasil como “asa de papagaio” (IACOMINI et al., 1987), e é um dos poucos líquens onde o micobionte é um basidiomiceto e não um ascomiceto. O fotobionte presente neste líquen é a cianobactéria *Scytonema* sp.

Anteriormente, outras denominações tais como, *Dictyonema pavonium* (Swartz) Parm; e *Cora pavonia* (Swartz) Fr. eram atribuídas a este organismo (HAWKSWORTH, 1988).

Ocorre principalmente sobre o solo e, eventualmente, sobre rochas e córtex de árvores onde se encontram distribuídos, principalmente, nas regiões tropicais.

1.4.3 *Leptogium* spp. (Família Collemataceae)

O gênero *Leptogium* (Ach.) Gray, pertencente a família Collemataceae, é um gênero cosmopolita de 250 espécies. Este associa-se simbioticamente a cianobactérias do gênero *Nostoc*, formando os líquens gelatinosos. Ao contrário da maioria dos

liquens, onde o fungo determina a morfologia, a característica gelatinosa do talo liquênico é conferida pela alga.

Espécies pertencentes ao gênero *Leptogium* ocorrem sobre árvores e rochas, em ambientes normalmente mais úmidos que os liquens não-gelatinosos.

1.4.4 *Parmotrema* spp. e *Rimelia* spp. (Família Parmeliaceae)

Os liquens dos gêneros *Parmotrema* e *Rimelia* pertencem a família Parmeliaceae. Esta família compreende mais de 2000 espécies (80 gêneros), sendo principalmente do tipo folioso e fruticoso.

Estes gêneros são um exemplo de dados taxonômicos conflitantes, pois o gênero *Rimelia* foi segregado do gênero *Parmotrema* (HALE; FLETCHER, 1997) com base em reações coloridas atribuídas às diferenças estruturais de polissacarídeos dentre diferentes grupos de liquens. CRESPO e CUBERO (1998) e LOUWHOFF e CRISP (2000) propuseram a reavaliação desta segregação, fazendo-se uso de análises de DNA.

Os gêneros *Parmotrema* e *Rimelia* apresentam a alga *Trebouxia* como fotobionte e morfologia do tipo folioso.

1.4.5 *Roccella decipiens* (Família Roccellaceae)

Roccella decipiens Darb. (família Roccellaceae) apresenta uma morfologia do tipo fruticoso e associa-se simbioticamente a algas verdes do gênero *Trentepohlia*, uma alga verde filamentosa. Dentro do talo liquênico, este fotobionte sofre interessantes alterações estruturais, formando apenas filamentos curtos e delgados ou consistindo de estágios unicelulares (FRIEDL; BÜDEL, 1996).

1.4.6 *Umbilicaria mamullata* (Família Umbilicariaceae)

Umbilicaria mamulata (Ach.) Tuck. Gier Kendrick (família Umbilicariaceae) apresenta uma morfologia do tipo folioso e associa-se simbioticamente a algas verdes do gênero *Trebouxia*. Estes crescem sobre rochas e são conhecidos como “*rock tripe*”.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FUNGOS LIQUENIZADOS

3.1.1 *Cladina* spp.

Cladina arbuscula (Wallr.) Hale & W. L. Culb. (36 g) foi coletada na Finlândia, Província de Uusimaa. *Cladina confusa* (Sant.) Follm. & Ahti (37 g), foi coletada na Ilha do Mel, Paraná, Brasil, e *Cladina substenius* (Abbayes) Hale & W. L. Culb. (80 g) em Massachusetts, USA. As três amostras foram coletadas em 1998.

A coleta e a identificação de *C. substenius* e *C. arbuscula* foram realizadas pelo Prof. Dr. Teuvo Ahti (Departamento de Botânica da Universidade de Helsinki, Helsinki, Finlândia). *C. confusa* foi coletada pela Prof^a. Dr^a. Sandra Mara Woranovicz-Barreira (Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná - UFPR) e identificada pela Prof^a. Dr^a. Sionara Eliasaro (Departamento de Botânica – UFPR).

As exsicatas das três espécies estudadas encontram-se depositadas no herbário UPCB (Herbário do Departamento de Botânica da UFPR) sob os números 45901, 35700 e 45900, respectivamente (O nome do herbário segue aquele determinado por HOLMGREN et al., 1990).

3.1.2 *Dictyonema glabratum*

Dictyonema glabratum (Sprengel) D. Hawksw. (43 g) foi coletado pela Prof^a. Dr^a. Selene Elíbio Espósito (Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC-PR) na Estrada da Graciosa, PR, 1 Km após o posto da Polícia Florestal, na direção de Morretes, numa altitude de 900 m. A coleta foi realizada em 2000 e a identificação foi feita Prof^a. Dr^a. Sionara Eliasaro.

A exsicata encontra-se depositada no herbário UPCB sob o número 49402.

3.1.3 *Leptogium* spp.

Foram coletadas 2 espécimes (*Leptogium azureum* (Sw.) Mont., 100 g; *Leptogium* sp. 30 g) de líquens deste gênero nas proximidades do Rio Nhundiaquara, localizado na Estrada da Graciosa, PR, em 2001.

A identificação de uma das amostras (*Leptogium azureum*) foi feita Prof^a. Dr^a. Sionara Eliasaro, enquanto que a identificação quanto à espécie da outra amostra está sendo realizada.

As exsicatas dos líquens *Leptogium azureum* e *Leptogium* sp. encontram-se depositadas no herbário UPCB sob n° 49400 e 49403, respectivamente.

3.1.4 *Parmotrema* spp.

Parmotrema austrosinense (Zahlbr.) Hale (41 g), *P. delicatulum* (Vain.) Hale (32 g), *P. schindlerii* Hale (35 g), *P. mantiqueirense* Hale (43 g) e *P. tinctorum* (Nyl.) Hale (60 g) foram coletadas em 1996, no município da Lapa, Paraná, Brasil. Sendo a coleta e identificação realizada pela Prof^a. Dr^a. Sionara Eliasaro.

As exsicatas de todas as espécies encontram-se depositadas no herbário UPCB sob os números 33886, 33354, 33890, 33355, 28838, respectivamente.

3.1.5 *Rimelia* spp.

Rimelia cetrata (Ach.) Hale & Fletcher (31 g) e *R. reticulata* (Taylor) Hale & Fletcher (26 g) foram coletadas em Curitiba, PR, pela Prof^a. Dr^a. Sionara Eliasaro.

As exsicatas encontram-se depositadas no herbário UPCB sob os números 38057 e 38118, respectivamente.

3.1.6 *Roccella decipiens*

Roccella decipiens Darb. (13 g) foi coletada na Península “Baja Califórnia” (Cabo de San Lucas), México, pela Prof^a. Dr^a. Elfriede Stocker-Wörgötter (Institute of Plant Physiology, University of Salzburg, Salzburg, Austria), em 2002. A exsicata foi depositada na sua coleção privada sob n° 526 e uma duplicata (n° 49052) no herbário UPCB.

3.1.7 *Umbilicaria mammulata*

O fungo liquenizado *Umbilicaria mammulata* (Ach.) Tuck. Gier Kendrick (107 g) foi coletado em Wisconsin, USA, pelo Prof. Dr. Teuvo Ahti em 2002. A exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica, Universidade de Wisconsin, Madison, USA, sob n° 61176; e uma duplicata no herbário UPCB sob n° 49053.

3.2 PROCEDIMENTOS GERAIS DE EXTRAÇÃO

Os líquens foram limpos manualmente com a finalidade de retirar os contaminantes presentes. Em seguida, os materiais foram submetidos aos processos seqüenciais de extração e purificação, conforme os itens descritos de forma geral a seguir. Os diferentes tipos de extração realizados para cada gênero serão discutidos detalhadamente na seção resultados e discussões.

3.2.1 Extração Clorofórmio-Metanol

Os líquens limpos e secos foram deslipidificados com uma mistura de solvente clorofórmio-metanol (CHCl₃: MeOH, 2:1, v/v), sob refluxo, durante 2 ou 3 horas na temperatura de ~60°C. Após este procedimento, os extratos clorofórmio-metanólicos foram obtidos por filtração a quente e evaporados em rotaevaporador até *secura*.

Os resíduos liquênicos foram secos e então submetidos ao próximo processo de extração.

3.2.2 Extração Metanol-Água

Os resíduos liquênicos da extração anterior foram submetidos à extração com uma mistura de solventes MeOH:H₂O (4:1, v/v), sob refluxo, durante 2 ou 3 horas, na temperatura de ~80°C. Decorrido o tempo, os extratos foram obtidos por filtração e evaporados até secura em rotaevaporador.

Os materiais residuais foram então submetidos aos processos extrativos descritos a seguir.

3.2.3 Extração Aquosa

Os materiais remanescentes do processo anterior foram submetidos à extrações aquosas a 25°C ou sob refluxo em banho com H₂O fervente, durante 3 horas. Os materiais foram filtrados com a solução ainda a quente.

Os extratos obtidos foram concentrados em rotaevaporador e precipitados com etanol (3:1, v/v). Os precipitados etanólicos obtidos foram dialisados, em água corrente, por 48 horas. Decorrido o tempo, as misturas polissacarídicas em solução foram congeladas e liofilizadas.

Os líquens residuais foram submetidos ao próximo processo extrativo.

3.2.4 Extração Alcalina

Os líquens residuais da extração anterior foram tratados com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH 1%, 2% e/ou 10%), sob refluxo em banho com H₂O fervente, na presença de boroidreto de sódio (NaBH₄) para evitar degradação das cadeias polissacarídicas. Após o tempo determinado (2, 3 ou 6 horas), os extratos obtidos foram filtrados por algodão ainda a quente. Este processo foi repetido sob as

mesmas condições, após o que os extratos foram reunidos, dialisados e concentrados em rotaevaporador.

3.2.5 Extração com Dimetilsulfóxido

Uma alíquota (7 g) do líquen *Umbilicaria mammulata* foi triturado e submetido à extração diretamente com Me₂SO (300 ml) por 48 h a 25°C. Decorrido o tempo, o resíduo líquênico foi separado por filtração e ao filtrado foi adicionado EtOH em excesso (3:1, v/v). O precipitado obtido foi dialisado e liofilizado.

3.3 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS

3.3.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

As frações obtidas através das extrações aquosas e alcalinas foram submetidas, separadamente, ao processo de purificação por congelamento e degelo. Cada mistura polissacarídica foi solubilizada em água destilada e, a seguir, submetida ao processo de congelamento e posterior degelo na temperatura ambiente. O precipitado insolúvel em água fria foi separado dos demais componentes solúveis por centrifugação (9000 rpm, 15 min, 25°C). Esse processo de purificação foi repetido diversas vezes até que o sobrenadante aquoso não apresentasse mais precipitado por congelamento e degelo.

3.3.2 Purificação dos Polissacarídeos com Solução de Fehling

Os sobrenadantes ou precipitados do processo de congelamento e descongelamento foram submetidos à purificação com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Esta solução consiste de duas soluções (A e B). A solução A é composta por tartarato de potássio e sódio e KOH (173 g + 125 g / H₂O q.s.p. 500 ml, respectivamente), enquanto que a B consiste de sulfato de cobre 5.H₂O (55,7 g / H₂O q.s.p. 500 ml).

À fração sobrenadante, que foi dissolvida em volume de água suficiente para solubilizá-la, adicionou-se igual volume da solução de Fehling (A+B). Após vigorosa agitação manual, o material foi mantido sob refrigeração por 12 horas.

Decorrido o tempo, o precipitado formado foi separado por centrifugação (9000 rpm, 15 min, 25°C). As frações obtidas (precipitado e sobrenadante) foram neutralizadas com ácido acético (HOAc) e dialisadas contra água corrente (~ 48 horas) e então deionizadas por resinas Dowex na forma catiônica. Após, os materiais foram concentrados sob pressão reduzida e liofilizados.

A fração insolúvel em água (precipitado do processo de congelamento e descongelamento) foi solubilizada na solução A. Após solubilização foi adicionado igual volume da solução B. O processo de separação e descomplexação foi idêntico ao realizado para a fração sobrenadante, o qual foi descrito anteriormente.

3.3.3 Purificação dos Polissacarídeos por Ultrafiltração ou por Diálise em Membranas

As frações, que se mostraram heterogêneas após precipitação por solução de Fehling, foram submetidas à ultrafiltração em membranas de celulose regenerada ou polietersulfona com limite de exclusão de 10 kDa e/ou 300 kDa (Millipore). As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração adequado (modelo 16249, Sartorius) acoplado a um cilindro de ar comprimido.

A purificação destes polissacarídeos também foi realizada por diálise fechada, contra água destilada, através de membrana com limite de exclusão de 16 kDa. O material a ser dialisado era mantido sob agitação magnética, sendo o processo interrompido quando a água de diálise apresentasse reação negativa para carboidratos por meio do método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

3.4.1 Composição Monossacarídica

3.4.1.1 Hidrólise ácida total

Alíquotas de polissacarídeos (~ 1 mg) foram tratadas com 1,0 ml de TFA (ácido trifluoroacético) 2 M, durante 8 horas a 100°C ou TFA 1 M a 100°C, *overnight* (12-15 h). Após este tempo, o ácido foi eliminado das amostras hidrolisadas por evaporação à secura. Parte dos produtos hidrolisados foi solubilizada em água e analisada por cromatografia de partição em papel e o restante foi levado a derivatização (redução e acetilação), conforme o item 3.4.1.2.

3.4.1.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise

Os produtos de hidrólise foram reduzidos com NaBH_4 (boroidreto de sódio) ou NaB^2H_4 (boroidreto de sódio deuterado) (WOLFROM; THOMPSON, 1963a) em temperatura ambiente, pH 9-10, por 15 horas. Após este período, as soluções reduzidas foram tratadas com resina catiônica (pH 7,0) (procedimento A) ou neutralizadas com HOAc (procedimento B). A solução foi filtrada e levada à secura sob pressão reduzida. O ácido bórico formado foi eliminado por co-evaporação com metanol, na forma de borato de trimetila.

Os alditóis formados foram então acetilados com uma mistura de anidrido acético (Ac_2O)/piridina [1:1 (v/v)] *overnight* (WOLFROM; THOMPSON, 1963b), a temperatura ambiente (procedimento A) ou Ac_2O / NaOAc (acetato de sódio) a 120°C por 1 h (procedimento B) (WHITON et al., 1985). O processo foi interrompido por adição de gelo e o material acetilado extraído com clorofórmio. A piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida por sucessivas lavagens deste extrato com uma solução de sulfato de cobre 5%. Após remoção total da piridina, a fração clorofórmica foi desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada por algodão

(procedimento A). Para o procedimento B, a mistura reacional foi removida por sucessivas lavagens com água destilada. Após secura, os acetatos de alditóis obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

3.4.2 Teste de Homogeneidade e Determinação da Massa Molar

3.4.2.1 Cromatografia em gel permeação

Amostras de polissacarídeos (2 mg) foram dissolvidas em NaOH 1M, e aplicadas em coluna de Sepharose CL-6B (32 cm x 1.0 i.d.). O eluente utilizado foi NaOH 0,1 M e o volume das frações coletadas igual a 1 ml.

As frações coletadas foram monitoradas por meio do método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A calibração da coluna foi efetuada com a eluição de dextranas padrão (Sigma) de diferentes massas molares ($40,2 \times 10^3$; $77,8 \times 10^3$; $2,66 \times 10^5$ e $4,78 \times 10^5$).

3.4.2.2 Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS)

As amostras foram solubilizadas em nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ contendo azida de sódio (NaN_3) $0,2 \text{ g.l}^{-1}$ ou água MilliQ para uma concentração final de 2 mg.ml^{-1} , sendo filtradas através de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro equivalente a $0,22 \mu\text{m}$. Em seguida foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz em multiângulos WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP-F. Foram utilizadas, em série, 4 colunas de gel permeação WATERS com limites de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , 5×10^3 . O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ contendo azida de sódio (NaN_3) $0,2 \text{ g.l}^{-1}$, com fluxo de $0,6 \text{ ml.min}^{-1}$, monitorado através de bomba peristáltica WATERS 515.

A taxa de variação do índice de refração com a concentração (dn/dc) foi determinada para as amostras purificadas, sendo que para cada amostra foram utilizadas 5 concentrações. Para isto, foi preparada uma solução na concentração de 1 mg.ml⁻¹ em NaNO₂ 0,1 mol.l⁻¹ contendo NaN₃ 0,2 g.l⁻¹, filtrada em membrana de tamanho de poro equivalente a 0,45 µm, sendo então diluída nas concentrações de 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 mg.ml⁻¹.

3.4.3 Metilação

Uma alíquota de cada polissacarídeo (2-5 mg) foi metilada segundo CIUCANU e KEREK (1984). Nesta técnica, a amostra a ser analisada foi dissolvida (1%, p/v) em dimetilsulfóxido (Me₂SO). Após a solubilização, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) seco e triturado (4:1 de carboidrato). A solução foi mantida sob agitação e, então, foi adicionado iodeto de metila (CH₃I) na proporção CH₃I/NaOH/carboidrato recomendada (1:200:50). Após 24 horas, a amostra foi neutralizada com HOAc, dialisada, exaustivamente, contra água corrente, liofilizada e o processo foi repetido novamente. Terminada a metilação por este método, fez-se a extração dos produtos per-*O*-metilados com CHCl₃, que após secar, foi submetido à metanólise (seção 3.4.3.1) ou diretamente à hidrólise (seção 3.4.3.2).

3.4.3.1 Metanólise

Os produtos metilados foram metanolisados com ácido clorídrico (HCl) gasoso ~3% em metanol (1 ml) a 70-80°C por 2 horas. Decorrido o tempo, a solução foi neutralizada com carbonato de prata (Ag₂CO₃), filtrada e evaporada. O material metanolisado obtido foi hidrolisado conforme descrito a seguir.

3.4.3.2 Hidrólise para formar os produtos parcialmente *O*-metilados

A hidrólise ácida total dos polissacarídeos metilados e metanolizados foi feita com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 M (1 ml), por 14 horas a 100°C, e posteriormente, neutralizada com carbonato de bário (BaCO_3).

Os polissacarídeos parcialmente metilados, que não foram submetidos à metanólise, foram hidrolisados com H_2SO_4 50% (v/v; 0,5 ml) por 1 hora a 0°C, seguido por diluição até 5,5% (v/v; adição de 4,0 ml de água destilada) o qual foi mantido a 100°C por 14-18 horas, seguido por neutralização com BaCO_3 (SAEMAN et al., 1954).

3.4.4 Dosagem de Ácidos Urônicos

O método colorimétrico do sulfamato/*m*-hidroxibifenila (sensibilidade de 38,8 µg de ácido urônico em 0,4 ml de amostra) foi utilizado para as determinações do conteúdo de ácido urônico das amostras, conforme descrito por FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). Para tanto, a 0,4 ml de amostra adicionaram-se 40 µl de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio (4 mol/l, pH 1,6) e 2,4 ml de solução de tetraborato de sódio 75 mmol.l⁻¹ em H_2SO_4 concentrado. Após aquecimento sob refluxo em banho com H_2O fervente, por 20 min, foram adicionados 80 µl de *m*-hidroxibifenila. O cromógeno obtido, cuja coloração é estável por 1 h, foi avaliado em 525 nm. A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácido glucurônico (Sigma) dentro da sensibilidade do método.

3.4.5 Carboxi-redução do Heteropolissacarídeo Ácido Isolado do Líquen *Leptogium* sp.

O processo de carboxi-redução foi realizado segundo TAYLOR e CONRAD (1972). O polissacarídeo (200 mg) foi dissolvido em 10 ml de tampão MES [ácido 2-(*N*-morfolina)-etanosulfônico] (0,2 M, pH 4,75) e a este se adicionou, pouco a pouco e

sob agitação, 1,152 g de carbodiimida [ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida]. A mistura de reação ficou sob agitação por duas horas. Decorrido este tempo, o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de tampão TRIS/HCl (2 M, pH 7,0; 10 ml). A amostra foi então reduzida com NaBH₄, para uma concentração final de 2 M, durante 2 h, sendo interrompida pela adição de HOAc até pH 5,0. Finalmente, o material foi dialisado em membrana com limite de exclusão de 8 kDa durante 48 horas, concentrado e liofilizado. O processo de carboxi-redução foi novamente realizado, bem como a dosagem de ácidos urônicos. O polissacarídeo resultante foi denominado PFHW-CR.

3.4.6 Degradação de Smith

Alíquotas de polissacarídeos foram dissolvidos em água e acrescidas de periodato de sódio (NaIO₄) até atingir uma concentração final de 0,05 M. Cada solução foi mantida por 72 ou 96 horas sob ausência de luz. O processo de oxidação foi interrompido pela adição de etileno glicol e diálise exaustiva contra água corrente. A solução foi reduzida com NaBH₄ (pH 9-10) por 24 horas (ABDEL-AKHER et al., 1952; DYER, 1956; HAY; LEWIS; SMITH, 1965). Em seguida, a amostra foi tratada com resina catiônica (pH 7,0), dialisada por 48 horas e submetida à hidrólise ácida parcial (TFA, pH 2,0, por 30 minutos sob refluxo em banho com água fervente) ou total (TFA 1 M, 100°C por 8 h).

Os polissacarídeos previamente oxidados com NaIO₄ foram submetidos à hidrólise ácida parcial com TFA, pH 2,0, por 30 minutos sob refluxo em banho com água fervente. Após, a solução foi neutralizada e precipitada com EtOH (5:1, v/v), sendo o precipitado dialisado, em água corrente, em membranas com limite de exclusão de 2 kDa.

Para a β-glucana isolada do líquen *Parmotrema austrosinense*, o material hidrolisado (TFA, pH 2,0 por 30 minutos sob refluxo em banho com água fervente) foi evaporado até *secura* em rotaevaporador, e então analisado por HPLC, conforme descrito no item 3.5.3.

Os materiais submetidos a hidrólise total foram reduzidos (NaBH_4) e acetilados conforme descrito na seção 3.4.1.1 e 3.4.1.2, respectivamente, e analisados por GC-MS.

3.4.7 Hidrólise Ácida Parcial

Com a finalidade de remoção das unidades furanosídicas presentes nas galactomananas obtidas dos líquens *Rocella decipiens* e *Umbilicaria mammulata*, as mesmas foram submetidas a hidrólises ácidas parciais com TFA pH 2,0 sob refluxo em banho com H_2O fervente, por 18 h. Decorrido o tempo, as soluções foram dialisadas em membranas com limite de exclusão de 2 kDa e então liofilizadas.

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3.300 acoplado a um espectrômetro de massa de marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) revestidas DB-225 ou DB 210. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se de 50°C (mantida por 1 min), seguindo-se um aumento gradual de 40°C.min⁻¹ até 215°C (acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados) ou 220°C (acetatos de alditóis), sendo mantida isotermicamente até o final da análise. Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 ml.min⁻¹.

3.5.2 Cromatografia de Partição em Papel (CP)

As análises cromatográficas qualitativas dos monossacarídeos foram realizadas pela técnica descendente, com o sistema de solvente 1-butanol-piridina-água (5:3:3, v/v), em papel Whatman nº 1 (HOUGH; JONES, 1962).

A detecção dos carboidratos foi realizada com as soluções de AgNO_3 (nitrato de prata) saturada seguida por solução alcoólica de NaOH (NaOH 40%: EtOH, 1:250) (TREVELYAN et al., 1950).

3.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em aparelho SHIMADZU com detector de índice de refração (RID 10A, SHIMADZU). Foi utilizada uma coluna para ácidos orgânicos (coluna HPX-87H 300 x 780 mm - AMINEX® ion exclusion-BIO RAD) a 65°C. A fase móvel foi uma solução de ácido sulfúrico 8 mmol.l⁻¹ em água ultrapura (Milli-Q), degaseificada com gás hélio, com um fluxo de 0,6 ml.min⁻¹. As amostras foram solubilizadas em água ultrapura (concentração final: 1 mg.ml⁻¹), filtradas através de membrana de acetato de celulose (Millipore) com membrana de tamanho de poro equivalente a 0,22 µm e, então, analisadas. O volume de injeção foi de 50 µl. A amostra foi identificada por comparação com o tempo de retenção dos padrões (eritritol e 2-O-β-D-glucopiranosil-D-eritritol).

3.5.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros mono [RMN-¹³C, -¹H e DEPT (*Distortionless enhancement by polarization transfer*)] e bidimensionais [HMQC (*Heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy*), HSQC (*Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy*), HSQC-DEPT, COSY (*Correlation spectroscopy*), TOCSY (*Total correlation spectroscopy*) e ROESY (*Rotational nuclear Overhauser Effect*)]

Spectroscopy)] foram obtidos pelo uso de espectrômetro BRUKER, modelo Avance-DRX-400 (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR) ou Avance™ 500 (Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche “G. Ronzoni”, Milano, Italy).

As análises foram realizadas a 30°C, 50°C ou 70°C, com as amostras sendo solubilizadas em D₂O (óxido de deutério), Me₂SO-*d*₆ ou NaOD 3% em D₂O, dependendo da sua solubilidade. Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em D₂O ou NaOD - D₂O foram expressos em δ (ppm) relativos aos sinais de ¹³C e ¹H da acetona em δ 30.20 e 2.22, respectivamente, e aos sinais do Me₂SO-*d*₆ em δ 39.70 (¹³C) e 2.40 (¹H), para as amostras solúveis no mesmo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na presente pesquisa, foram estudadas 15 espécies de fungos liquenizados quanto aos seus componentes polissacarídicos. Estes pertencem aos gêneros *Cladina*, *Dictyonema*, *Leptogium*, *Parmotrema*, *Rimelia*, *Roccella* e *Umbilicaria*.

Conforme descrito anteriormente (Material e Métodos), cada líquen sofreu o processo de extração e purificação exposto nos esquemas descritos a seguir. Em geral, os líquens estudados foram, primeiramente, deslipidificados e então submetidos aos procedimentos de extrações e purificações de carboidratos de alta massa molar.

Com a finalidade de melhor entendimento, cada gênero em estudo será discutido separadamente.

4.1 Polissacarídeos de *Cladina* spp.

As amostras (*Cladina arbuscula*, 36 g; *C. confusa*, 37 g; *C. substenius*, 80 g) foram tratadas, de forma sucessiva, com CHCl_3 :MeOH (2:1, v/v) e MeOH:H₂O (4:1, v/v), com a finalidade de remover os componentes de baixa massa molar.

O material residual foi submetido à extração alcalina com solução aquosa de KOH 10% sob refluxo em banho com água fervente, durante 3 horas (3 x). Os extratos alcalinos obtidos de cada espécie de *Cladina* foram neutralizados (HOAc), dialisados contra água corrente e precipitados com etanol (3:1, v/v). Os polissacarídeos obtidos foram ressuspensos em água, congelados e então descongelados, resultando na formação de um precipitado (PGD) e um sobrenadante (SGD) (Figura 6).

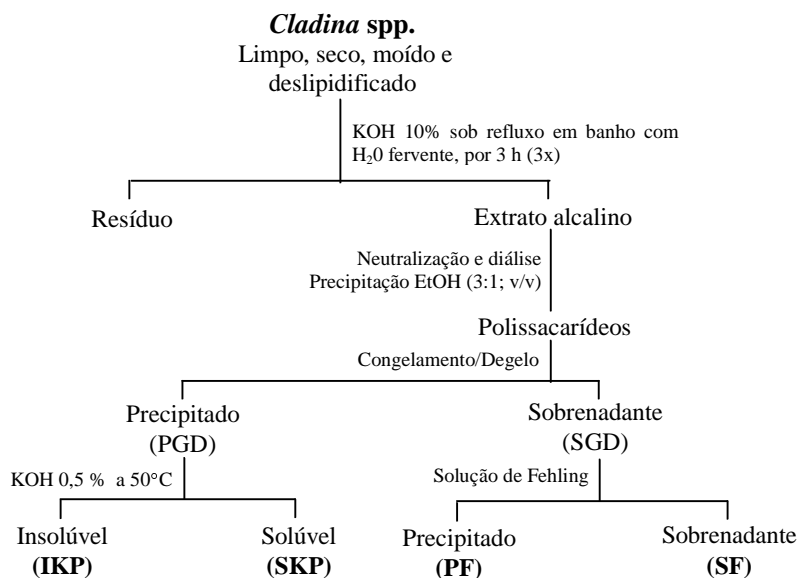


FIGURA 6 - Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos de *Cladina* spp.

A fração sobrenadante de gelo/degelo (SGD) foi submetida ao tratamento de purificação por precipitação com solução de Fehling, resultando na formação de um sobrenadante (SF) e um precipitado (PF). Enquanto que, a fração obtida por precipitação no processo de gelo/degelo (PGD) foi submetida ao tratamento com solução aquosa de KOH 0,5% a temperatura de 50°C, resultando em uma fração insolúvel em água (IKP) e outra solúvel (SKP) sob estas condições (Figura 6).

4.1.1 Caracterização Estrutural das Frações IKP (insolúveis em KOH 0,5%; nigeranas)

Análise de composição monossacarídica da fração PGD revelou a presença de altos teores de glucose (Tabela 4), sugerindo a presença de glucanas.

TABELA 4 - Composição monossacarídica e rendimento dos polissacarídeos obtidos de *Cladina* spp.

FRAÇÕES	<i>C. arbuscula</i>		<i>C. confusa</i>		<i>C. substenius</i>	
	Man:Gal:Glc (mol%) ⁽¹⁾	g% ⁽²⁾	Man:Gal:Glc (mol%) ⁽¹⁾	g% ⁽²⁾	Man:Gal:Glc (mol%) ⁽¹⁾	g% ⁽²⁾
PGD	02:00:98	2,5	01:01:98	3,1	00:01:99	1,6
SGD	63:32:05	8,5	60:32:08	15,3	58:36:06	10,9
PF	57:40:03	3,2	63:32:05	11,0	55:41:04	3,2
SF	41:47:12	1,5	40:49:11	3,4	47:40:13	3,4

(1) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

(2) Rendimento em relação ao peso seco do líquen.

Após purificação, a fração IKP referente a cada espécie (~2 g%) forneceu um espectro de RMN-¹³C com 12 sinais (Figura 7; Tabela 5), correspondendo a uma α -D-glucana contendo, alternadamente, ligações glicosídicas do tipo (1→3)- e (1→4), previamente encontrada em várias *Cladonia* spp. (WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a) e também em 4 espécies do gênero *Cladina* (IACOMINI et al., 1985; NISHIKAWA et al., 1974). Muitas outras α -glucanas, isoladas usando o processo de gelo-degelo, tem sido estudadas. Com exceção daquelas de *Flavoparmelia caperata* (TAKEDA et al., 1970) e *Ramalina* spp. (STUELP et al., 1999; CORDEIRO et al., 2003a), que apresentam uma relação molar de 1:1, todas as demais mostraram diferentes proporções molares de ligações (1→3)- e (1→4), variando entre 2:1 e 3:1 (GORIN et al., 1988). Para confirmar se este polissacarídeo é um “*fingerprint*” para gênero *Flavoparmelia*, outras espécies deverão ser investigadas, considerando que até a presente data somente uma espécie foi estudada.

O gênero *Ramalina* contém nigeranas (1:1), isoliquenanas e laminaranas, enquanto que *Cladina* e *Cladonia* apresentam apenas nigeranas (1:1) e laminaranas como glucanas.

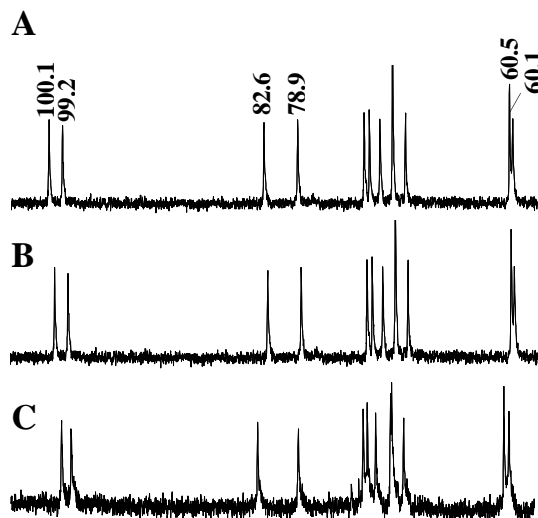


FIGURA 7 - Espectros de RMN- ^{13}C da fração insolúvel em KOH 0,5% (IKP; nigeranas) em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ (70°C) obtidos de *Cladina arbuscula* (A), *C. confusa* (B) e *C. subtenius* (C).

TABELA 5 - Dados de RMN- ^{13}C e ^1H das nigeranas (IKP) e laminaranas (SKP), obtidos de *Cladina* spp.

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	Fração IKP				Fração SKP	
	α (1→4)		α (1→3)		β (1→3)	
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)
H-1/C-1	5.23	100.1	5.14	99.2	4.55	102.9
H-2/C-2	3.55	70.6	3.48	71.9	3.31	72.9
H-3/C-3	3.73	72.6	3.70	82.6	3.49	86.2
H-4/C-4	3.57	78.9	3.52	69.5	3.27	68.4
H-5/C-5	3.88	73.1	4.03	70.5	3.27	76.3
H-6/C-6	3.63	60.5	3.76	60.1	3.48/3.72	60.8

4.1.2 Caracterização Estrutural das Frações SKP (solúveis em KOH 0,5%; laminaranas)

Nas espécies de *Cladina* que foram estudadas, a fração solúvel em KOH 0,5% a 50°C (SKP; ~ 0,4 g%) forneceu glucanas idênticas às aquelas β -glucanas (1→3), devido aos característicos espectros de RMN- ^{13}C (Figura 8, Tabela 5).

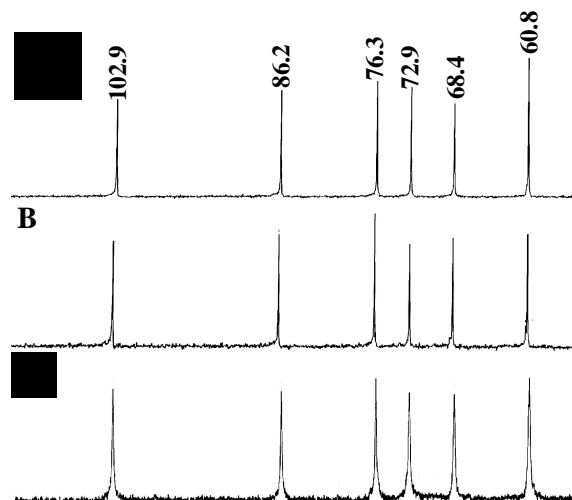


FIGURA 8 - Espectros de RMN- ^{13}C da fração solúvel em KOH 0,5% (SKP; laminaranas) em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ (70°C) obtidos de *C. arbuscula* (A), *C. confusa* (B) e *C. substenius* (C).

β -D-Glucanas do tipo laminarana são polissacarídeos insolúveis em água fria e foram isoladas das 15 espécies de *Cladonia* estudadas (CARBONERO et al., 2001). Isto indica que elas deverão estar presentes em todos os líquens deste gênero. Estas também foram obtidas de *Stereocaulon ramulosum* (BARON et al., 1988) e *Ramalina* spp. (STUELP et al., 1999; CORDEIRO et al., 2003a).

4.1.3 Caracterização Estrutural da Fração Precipitado de Fehling (PF; galactoglucomananas)

A fração PF foi obtida via precipitação de Fehling da fração solúvel em água. Heteropolissacarídeos de *C. arbuscula* (3,2 g%), *C. confusa* (11,0 g%) e *C. substenius* (3,2 g%) apresentam M_w $1,9 \times 10^6$, e, como monossacarídeos constituintes, manose, galactose e glucose numa relação molar de 57:40:3, 63:32:5 e 55:41:4 (Tabela 4), respectivamente. Seus espectros de RMN- ^{13}C (Figura 9) mostraram em comum os principais sinais, mas possuem algumas diferenças as quais são típicas das espécies. Em geral, tem se demonstrado que os espectros de RMN- ^{13}C dos heteropolissacarídeos são característicos de cada espécie de líquen (WORANOVICZ et al., 1997; WORANOVICZ-BARREIRA, 1999a,c), portanto tem sido discutida a utilização desta técnica para classificação e identificação destes organismos (TEIXEIRA et al., 1995).

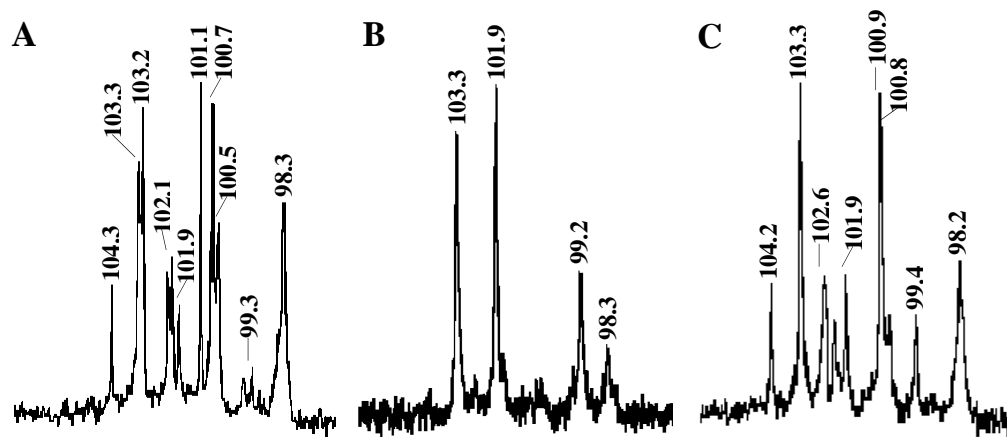


FIGURA 9 - Regiões anoméricas dos espectros de RMN- ^{13}C das frações precipitado de Fehling (PF; galactoglucomanana) em D_2O (30°C) obtidas de *C. arbuscula* (A), *C. confusa* (B) e *C. substenius* (C).

Análises de metilação mostraram estruturas complexas, com formação de um mínimo de 10 significantes acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (Tabela 6), similares àqueles obtidos para os heteropolissacarídeos de *Cladonia* e *Cladina* spp. (WORANOVICZ et al., 1997; WORANOVICZ-BARREIRA, 1999a,c; IACOMINI et al., 1985) (esta complexidade foi refletida nos espectros de RMN- ^{13}C , os quais contém vários sinais na região anomérica; Figura 9). Estes sinais correspondem, de acordo com os dados de metilação (Tabela 6), aos terminais não redutores de Galp (2,3,4,6-Me₄Gal) e Manp (2,3,4,6-Me₄Man) (*C. confusa* mostrou que os grupos terminais não redutores de Manp correspondem a 20%, ou seja, o derivado em maior proporção das três espécies), e unidades de Manp 2-*O*- (3,4,6-Me₃Man), 6-*O*- (2,3,4-Me₃Man), 4,6-*O*- (2,3-Me₂Man) (neste caso, o polímero de *C. confusa* apresenta a menor proporção deste derivado), 2,6-*O*- (3,4-Me₂Man) e 2,4,6-*O*- (3-MeMan) substituídas. Entretanto, o polissacarídeo de *C. confusa* apresenta unidades de Galp substituídas em *O*-3, diferentes dos de *C. arbuscula* e *C. substenius*, os quais apresentam substituição em *O*-4.

TABELA 6 - Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PF; galactoglucomanana) obtidas de *Cladina* spp.

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ⁽¹⁾	Precipitado de Fehling			Tipo de ligação ⁽²⁾
	<i>C. arbuscula</i>	<i>C. confusa</i>	<i>C. substenius</i>	
2,3,4,6-Me ₄ Man	8	20	11	Manp-(1→
2,3,4,6-Me ₄ Gal	29	24	27	Galp-(1→
3,4,6-Me ₃ Man	9	4	7	→2)-Manp-(1→
2,4,6-Me ₃ Glc	-	1	-	→3)-Glc p-(1→
2,3,6-Me ₃ Man	3	2	1	→4)-Manp-(1→
2,4,6-Me ₃ Gal	-	6	-	→3)-Galp-(1→
2,3,4-Me ₃ Man	5	5	7	→6)-Manp-(1→
2,3,6-Me ₃ Gal	11	2	14	→4)-Galp-(1→
2,3,6-Me ₃ Glc	3	4	4	→4)-Glc p-(1→
2,3-Me ₂ Man	12	4	11	→4,6)-Manp-(1→
3,4-Me ₂ Man	9	12	7	→2,6)-Manp-(1→
3-MeMan	11	16	11	→2,4,6)-Manp-(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, metanólise, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) Baseado nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilados. Os espectros de RMN-¹³C da fração precipitado de Fehling obtida das três espécies estudadas (Figura 9), contém sinais de C-1 que indicam estruturas, predominantemente, ramificadas com grupos terminais não redutores de β-D-Galp-(1→4)-α-D-Manp (δ 104.3), α-D-Galp-(1→2)-α-D-Manp (δ 102.8) e também α-D-Manp (δ 103.3) ligados (1→2) a unidades de α-D-Manp, assim como unidades de α-D-Manp 2,4-di-*O*-substituídas (δ 101.7) (GORIN; IACOMINI, 1984, 1985), 6-*O*- (δ 100.5) e 2,6-di-*O*-substituídas (δ 99.3) correspondentes à cadeia principal do polissacarídeo (GORIN, 1973).

4.1.4 Caracterização Estrutural das Frações Sobrenadantes de Fehling (SF; galactomanoglucanas)

Os sobrenadantes, obtidos após precipitação com solução de Fehling, forneceram polissacarídeos similares e homogêneos (*C. arbuscula*: 1,5 g% e 3,4 g% para os outras 2 espécies, *M_w* 1,75 x 10⁶). Eles apresentaram similaridades em seus espectros de RMN ¹³C (Figura 6) e Man, Gal, Glc numa proporção de 41:47:12 (*C.*

arbuscula), 40:49:11 (*C. confusa*) e 47:40:13 (*C. substenius*), respectivamente (Tabela 4).

O espectro de RMN- ^{13}C de cada galactomanoglucana mostrou complexidade em relação às cadeias laterais com sinais de C-1 de β -Galf em δ 106.0-108.3 (GORIN; BARRETO-BERGTER; CRUZ, 1981).

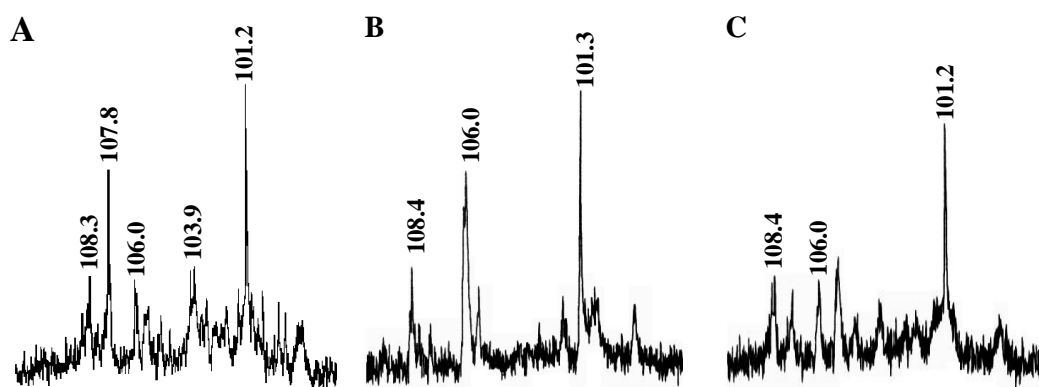


FIGURA 10 - Regiões anoméricas dos espectros de RMN ^{13}C das frações sobrenadante de Fehling (SF; galactomanoglucana) em D_2O (30°C) obtidas de *Cladina arbuscula* (A), *C. confusa* (B) e *C. substenius* (C).

Estes resultados estão de acordo com os dados de metilação, os quais mostraram 16-26% de grupos terminais não redutores de Galf (Tabela 7). Esta análise também sugere que as cadeias laterais são ramificadas (com unidades de Manp 2-*O*-, 4-*O*-, 6-*O*-, 2,3-di-*O*-substituídas; Galp 6-*O*-, 3,6-di-*O*-substituídas; e unidades de Glcp 2,3,6-tri-*O*-substituídas) as quais estão presentes em todas *Cladina* spp. investigadas.

TABELA 7 - Análise por metilação da fração sobrenadante de Fehling (SF; galactomanoglucana) obtidas de *Cladina* spp.

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ⁽¹⁾	Sobrenadante de Fehling			Tipo de ligação ⁽²⁾
	<i>C. arbuscula</i>	<i>C. confusa</i>	<i>C. substenius</i>	
2,3,4,6-Me ₄ Man	5	3	4	Manp-(1→
2,3,5,6-Me ₄ Gal	22	26	16	Galp-(1→
2,3,4,6-Me ₄ Gal	10	9	12	Galp-(1→
3,4,6-Me ₃ Man	16	9	19	→2)-Manp-(1→
3,4,6-Me ₃ Glc	3	2	4	→2)-Glc-(1→
2,4,6-Me ₃ Man	-	3	-	→3)-Manp-(1→
2,3,6-Me ₃ Man	7	6	11	→4)-Manp-(1→
2,3,4-Me ₃ Man	2	5	6	→6)-Manp-(1→
2,3,5-Me ₃ -Gal	7	6	6	→6)-Galp-(1→
4,6-Me ₂ Man	7	8	5	→2,3)-Manp-(1→
2,6-Me ₂ Gal	3	-	-	→3,4)-Galp-(1→
2,3-Me ₂ Man	4	2	1	→4,6)-Manp-(1→
3,4-Me ₂ Man	-	2	2	→2,6)-Manp-(1→
2,3-Me ₂ Gal	-	3	2	→4,6)-Galp-(1→
2,4-Me ₂ Gal	5	5	4	→3,6)-Galp-(1→
4-MeGlc	10	9	9	→2,3,6)-Glc-(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, metanólise, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) Baseado nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

Estes resultados coincidem com aqueles obtidos para as diversas espécies de líquens do gênero *Cladonia* (WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999d), os quais forneceram espectros de RMN-¹³C e dados de metilação praticamente idênticos, ou seja, galactomanoglucanas com cadeia principal de unidades de β-D-Glcp ligadas (1→3) e substituídas em O-2,6, principalmente, por cadeias laterais de unidades Galp e Manp.

Estes dados sugerem que os gêneros *Cladonia* e *Cladina* apresentam o mesmo heteropolímero encontrado na fração sobrenadante de Fehling.

4.2 α -Glucana (1 \rightarrow 3)-ligada, β -xilana (1 \rightarrow 4)-ligada e β -manana (1 \rightarrow 6)-ligada de *Dictyonema glabratum*

O basidiolíquen *Dictyonema glabratum* (43 g) foi submetido ao processo de extração conforme descrito na Figura 11.

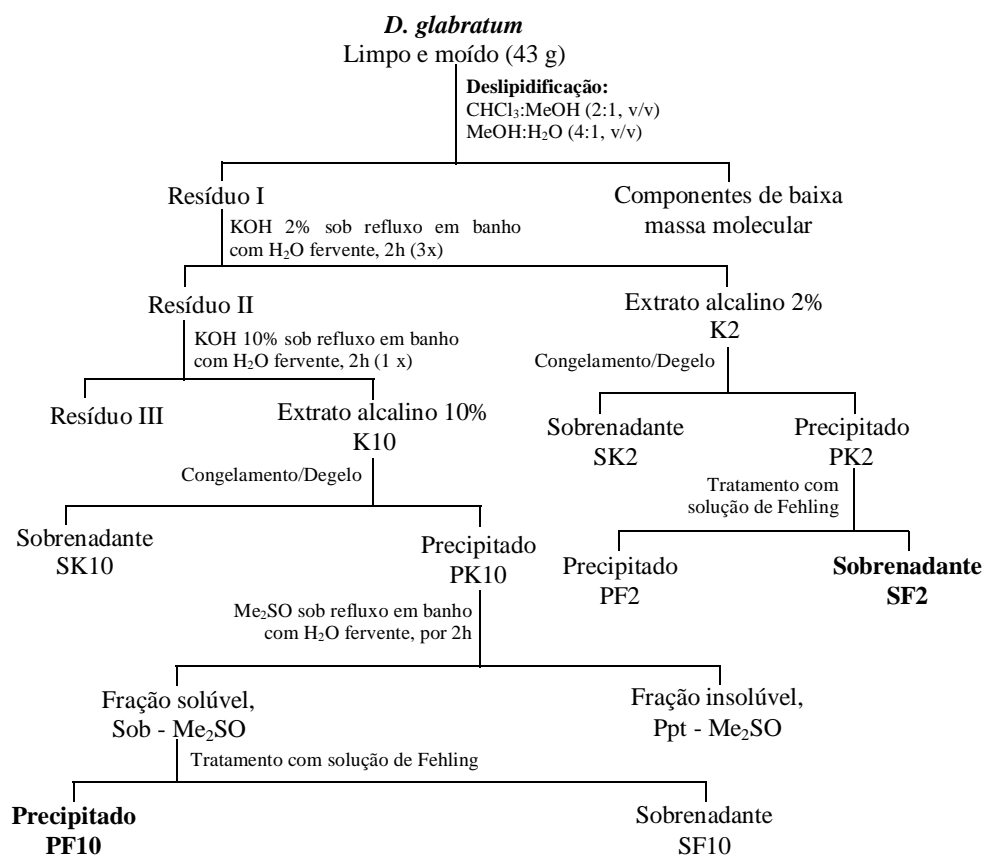


FIGURA 11 - Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos do líquen *Dictyonema glabratum*.

A amostra deslipidificada foi extraída, sucessivamente, com solução aquosa de KOH 2% (3x) e 10% (1x) sob refluxo em banho com H₂O fervente por 2 horas, com adição de NaBH₄. Os extratos alcalinos obtidos (2 e 10%) foram neutralizados (HOAc) e dialisados contra água corrente. Em seguida, os mesmos foram submetidos ao tratamento de purificação por congelamento e degelo. Os precipitados obtidos por

este processo foram separados por centrifugação. O precipitado de gelo e degelo- 2% (PK2) contém 94% glucose (Tabela 8).

TABELA 8 - Composição monossacarídica das frações isoladas de *D. glabratum*

<i>FRAÇÕES</i>	Rendimento (g %) ⁽¹⁾	<i>Monossacarídeos (mol %) ⁽²⁾</i>		
		<i>Glc</i>	<i>Xyl</i>	Man
PK2	0,8	94	4	2
PK10	2,3	58	38	4
Fração Solúvel - Me ₂ SO	0,6	6	64	30
Fração Insolúvel – Me ₂ SO	1,7	64	19	17
PF10	0,56	-	68	32
SF10	0,04	100	-	-

(1) Rendimento em relação ao peso seco do líquen.

(2) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

Com a finalidade de purificação, a fração PK2 foi submetida ao processo de purificação por precipitação com o reativo de Fehling, o qual levou a glucana ao sobrenadante (SF2; 0,76 g%). Para verificar a homogeneidade desta fração, a mesma foi submetida à cromatografia em gel permeação (Sephacrose CL-6B) a qual mostrou a presença de apenas um pico ($M_w \sim 7,0 \times 10^5$).

Análise de metilação desta fração forneceu os acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados que correspondem a grupos terminais não redutores de Glcp (2,3,4,6-Me₄Glc, traços) e unidades de Glcp 3-*O*-substituídas (2,4,6-Me₃Glc, 99,9%), mostrando uma estrutura linear (Tabela 9).

TABELA 9 - Análise por metilação dos polissacarídeos obtidos de *D. glabratum*

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ⁽¹⁾	Polissacarídeos (mol %)			Tipo de ligação ⁽²⁾
	Glucana	Xilana	Manana	
2,3,4,6-Me ₄ Glc	⁽³⁾ tr	-	-	Glc _p -(1→
2,3,4,6-Me ₄ Man	-	-	0,3	Man _p -(1→
2,3,4-Me ₃ Xyl	-	0,1	-	Xyl _p -(1→
2,4,6-Me ₃ Glc	99,9	-	-	→3)-Glc _p -(1→
2,3,4-Me ₃ Man	-	-	99,7	→6)-Man _p -(1→
2,3-Me ₂ Xyl	-	99,9	-	→4)-Xyl _p -(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, metanólise, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) Baseado nos derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

(3) Traços.

O espectro de RMN-¹H da fração SF2 indicou que a glucana com ligações do tipo (1→3) tem uma α -configuração, por virtude de um sinal de H-1 em campo baixo (δ 5.20), que está de acordo com o típico sinal de C-1 em campo alto em seu espectro de RMN-¹³C a δ 100.9. O espectro de RMN-¹³C contém 6 sinais, como esperado para um homopolissacarídeo linear (Tabela 10) e estes foram assinalados por COSY, TOCSY, HMQC e DEPT. O espectro de HMQC mostrou 7 sinais correlatos (¹H/ ¹³C). Neste foi possível observar um sinal em campo baixo na região a δ 83.7/3.77 confirmando a presença de unidades de α -Glc_p 3-*O*-substituídas e para C-6 não substituído foi observado um duplete em δ 61.2/3.87, 3.77. Este foi confirmado pela presença de um sinal de -CH₂ invertido na região de δ 61.2, na análise por RMN-¹³C-DEPT.

TABELA 10 - Dados de RMN-¹³C e ¹H para os polissacarídeos isolados de *D. glabratum* ⁽¹⁾

Próton	GLUCANA		XILANA		MANANA	
	→3)-α-Glcp-(1→	δ H/C	→4)-β-Xylp-(1→	δ H/C	→6)-β-Manp-(1→	δ H/C
H-1	5.20	100.9	4.27	102.6	4.29	104.8
H-2	3.87	71.3	3.15	72.8	3.07	72.9
H-3	3.87	83.8	3.28	74.1	3.32	73.8
H-4	3.39	70.8	3.54	75.7	3.17	77.6
H-5 ^a	3.51	73.1	3.17	64.1	3.18	77.6
H-5 ^b	-	-	3.87	-	-	-
H-6 ^a	3.57	61.2	-	-	3.07	66.6
H-6 ^b	3.87	-	-	-	3.74	-

(1) Dados obtidos dos seguintes experimentos: ¹³C, ¹H, COSY, TOCSY, HMQC e DEPT.

A fração constituída pelo precipitado de gelo e degelo obtida por extração com solução aquosa de KOH 10% a quente (PK10) apresentou glucose (58%), xilose (38%) e manose (4%) como monossacarídeos (Tabela 8). Esta fração foi submetida ao tratamento com Me₂SO a quente, resultando em uma fração insolúvel (Ppt- Me₂SO) uma solúvel (Sob- Me₂SO). A fração Sob-Me₂SO mostrou ser composta por xilose (64%), manose (30%) e glucose (6%). Com a finalidade de purificação, a fração PK10 foi purificada por tratamento com solução de Fehling, fornecendo uma fração solúvel (SF10; rendimento 0,04 g%) e outra insolúvel (PF10; rendimento 0,56 g%). A fração PF10 mostrou ser composta por manose e xilose (Tabela 8), sendo purificada por cromatografia de gel permeação. Este procedimento foi eficiente na separação, sendo obtida uma fração composta, principalmente, por manose e $M_w \sim 6,0 \times 10^4$ (manana) e outra apresentando, principalmente, xilose e $M_w \sim 1,8 \times 10^5$ (xilana). Análise de metilação apresentou derivados referentes a terminais não redutores de Xylp (2,3,4-Me₃Xyl, 0,1%) e Xylp 4-O-substituídas (2,3-Me₂Xyl, 99,9%), confirmada pelos fragmentos de massa m/z 118, 130 e 162 após redução com hidrólise, redução com NaB²H₄ e acetilação (Tabela 9). A estrutura da xilana foi confirmada através das análises de RMN-¹³C e ¹H. O espectro de RMN-¹³C contém apenas 5 sinais, consistente com um homopolímero linear (Tabela 10). A região anomérica contém

apenas 1 sinal em campo baixo a δ 102.6, o qual sugere que as unidades de Xylp tem um configuração glicosídica do tipo β . O sinal em δ 76.4 corresponde ao C-4 das unidades 4-*O*-substituídas (GORIN, 1973). A análise de RMN- ^{13}C -DEPT da xilana mostrou um sinal de $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ invertido em δ 64.1, que corresponde ao C-5.

Análise de metilação da manana mostrou a presença de terminais não redutores de Manp (2,3,4,6-Me₄Man, 0,3%) e unidades de Manp 6-*O*-substituídas (2,3,4-Me₃Man, 99,7%) (Tabela 9). O espectro de RMN- ^{13}C da manana contém 6 sinais, mostrando assim a presença de um polissacarídeo linear (Tabela 10). A configuração glicosídica tipo β foi indicada pela presença de um sinal de H-1 em campo alto a δ 4.23 no espectro de HMQC quando analisado em Me₂SO-*d*₆ (GORIN; SPENCER; BHATTACHARJEE, 1969). O sinal de C-6 em δ 66.6 indicou a presença de unidades de Manp 6-*O*-substituídas, confirmada por uma inversão do correspondente sinal de $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ na análise RMN- ^{13}C -DEPT (HMQC: duplete em δ 66.6/3.40, 3.06). Um polímero constituído por unidades de β -Manp contendo ligações glicosídicas do tipo (1→6) foi então demonstrado.

Os três polissacarídeos lineares obtidos não haviam sido observados anteriormente para os líquens. A α -glucana linear, também chamada de pseudonigerana, tem sido descrita em muitos fungos como *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *Tremella mesenterica*, *Schizophyllum commune*, *Paracoccidioides brasiliensis* e outros (GORIN; BARRETO-BERGTER, 1983)

A β -D-xilana linear ligada (1→4) ocorre em plantas superiores e algumas algas (AHMADJIAN, 1993), bem como nos fotobiontes de *R. celastri* (CORDEIRO et al., 2003b). Entretanto, este polímero nunca havia sido detectado em líquens intactos, possivelmente, devido à pequena proporção (1-10%) do fotobionte presente em fungos liquenizados (AHMADJIAN, 1993).

Provavelmente, o polissacarídeo mais interessante de *D. glabratum* é a β -D-manana linear contendo ligações glicosídicas do tipo (1→6) a qual não foi encontrado em nenhum organismo após vasta revisão em literatura.

Mananas lineares com ligações glicosídicas do tipo β ocorrem em plantas como polímeros contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 4) (STEPHEN, 1983) e com alternadas ligações (1 \rightarrow 3)- e (1 \rightarrow 4)-, nas leveduras *Rhodotorula* spp. (GORIN; HORITSU; SPENCER, 1965) e no protozoário *Crithidia deanii* (PREVIATO; MENDONÇA-PREVIATO; GORIN, 1979) e outros. Muitas mananas fúngicas são ramificadas e possuem α -ligações, embora algumas delas contêm misturas de α e β - ligações (GORIN; SPENCER; BHATTACHARJEE, 1969).

Estudos anteriores realizados com este fungo liquenizado (IACOMINI et al., 1987), mostrou a presença de polissacarídeos não usuais como uma glucana ramificada contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) e um heteropolissacarídeo contendo uma cadeia principal composta por unidades de α -D-Manp (1 \rightarrow 3)-ligadas, apresentando substituições em O-4 e O-2,4 por unidades de β -D-Xylp.

4.3 Polissacarídeos de *Leptogium* spp.

As amostras (*Leptogium azureum*, 100 g e *Leptogium* sp., 30 g) foram submetidas, sucessivamente, à extrações aquosas (25°C e sob refluxo em banho com H₂O fervente) e alcalinas (com adição de boroidreto de sódio), conforme a Figura 12. Os extratos obtidos (aquoso a 25°C: CW1 a CW6; aquoso a quente: HW1 a HW6; alcalino: K1) foram precipitados com etanol (3:1, v/v) e dialisados contra água corrente. Em seguida, os mesmos foram submetidos ao tratamento de purificação por congelamento e degelo resultando na formação de precipitados que foram separados por centrifugação.

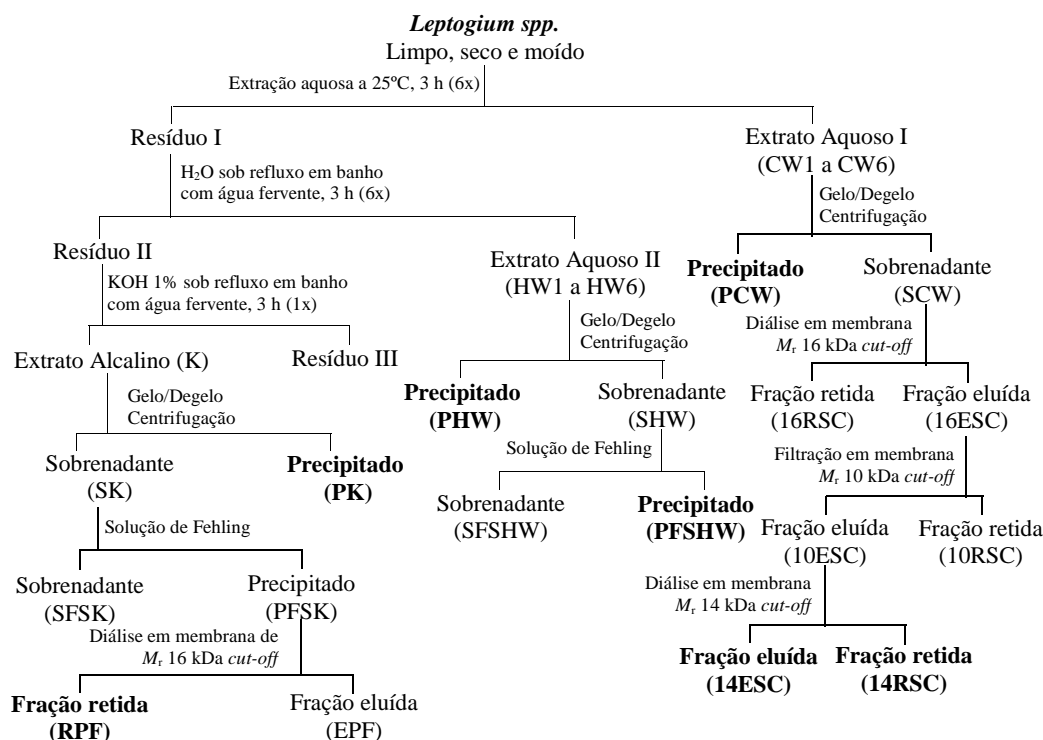


FIGURA 12 - Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos de *Leptogium* spp.

4.3.1 Polissacarídeos Obtidos por Extrações Aquosas

Os extratos aquosos (CW1 a CW6 e HW1 a HW6) obtidos dos líquens *Leptogium azureum* (denominado La) e *Leptogium sp.* (denominado L2) foram submetidos à purificação por congelamento e degelo, fornecendo precipitados (PCW1 a PCW6 e PHW1 a PHW6) e sobrenadantes (SCW1 a SCW6 e SHW1 a SHW6).

As frações precipitadas (PCW1 a PCW6 e PHW1 a PHW6), obtidas para as espécies em estudo, apresentaram baixo rendimento (~ 0,12 g%) e glucose como principal monossacarídeo (~94%). Devido à similaridade apresentada, as frações PCW1 a PCW6 e PHW1 a PHW6 foram reunidas, resultando nas frações PW-La e PW-L2, e analisadas por RMN- ^{13}C . Os espectros de RMN- ^{13}C (Figura 13A e B, respectivamente) obtidos foram idênticos àqueles obtidos para as β -glucanas ligadas (1 \rightarrow 3).

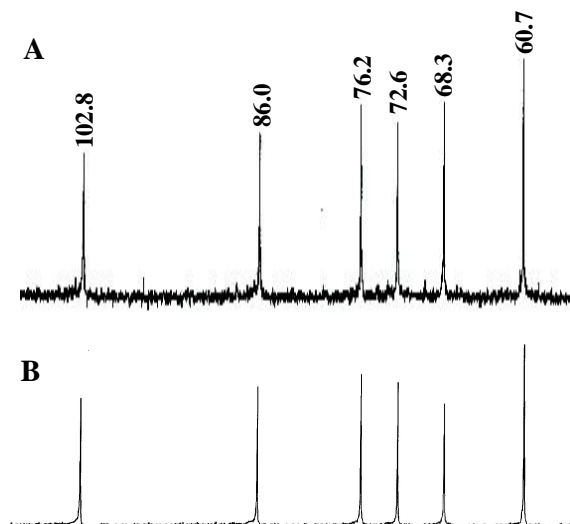


FIGURA 13 - Espectros de RMN- ^{13}C da fração PW (laminarana) em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ (70°C) obtida de *L. azureum* (A) e *Leptogium sp.* (B).

As frações solúveis em água fria, obtidas para o líquen *L. azureum*, apresentaram-se similares quanto a composição monossacarídica (Tabela 11) e ao perfil de eluição determinado por HPSEC. Portanto, as frações sobrenadantes obtidas a partir de extrações aquosas a frio (SCW1 a SCW6) ou a quente (SHW1 a SHW6), foram reunidas fornecendo as frações SCW-La e SHW-La, respectivamente. Esta similaridade também foi observada para as frações obtidas para a outra espécie em estudo, sendo agrupadas e denominadas SCW-L2 e SHW-L2.

Diferente dos fungos liquenizados previamente estudados, o referido gênero apresentou o derivado 3-*O*-metil galactose o qual foi confirmado pelos fragmentos de massa m/z 130 e 190 observados por GC-MS após hidrólise, redução com NaB^2H_4 e acetilação. Como pode ser observado (Tabela 11), um maior teor deste derivado foi encontrado para as frações aquosas obtidas de *Leptogium* sp.

TABELA 11 - Composição monossacarídica e rendimento das frações sobrenadante de gelo/degelo obtidas de *Leptogium* spp.

Frações		(g%) ⁽¹⁾	Monossacarídeos (mol%) ⁽²⁾				
			Xyl	Man	3- <i>O</i> -MeGal ⁽³⁾	Gal	Glc
<i>L. azureum</i>	SCW ₁	1,83	23,6	18,6	2,5	30,0	25,3
	SCW ₂	1,12	19,0	13,8	2,6	34,0	30,6
	SCW ₃	0,73	15,8	17,6	1,7	33,9	31,0
	SCW ₄	0,64	20,7	13,4	1,9	33,5	30,5
	SCW ₅	0,62	22,1	13,0	1,8	36,5	26,6
	SCW ₆	0,56	20,6	12,9	2,0	34,4	30,1
	SHW ₁	3,84	18,5	26,4	1,8	30,7	22,6
	SHW ₂	0,93	14,3	28,3	2,0	33,0	22,4
	SHW ₃	0,53	13,4	37,5	1,4	24,6	23,1
	SHW ₄	0,57	12,6	41,3	0,5	23,3	22,3
	SHW ₅	0,36	10,1	43,3	-	23,5	23,1
	SHW ₆	0,34	8,3	47,7	-	20,2	23,8
<i>Leptogium</i> sp.	SCW ₁	0,38	24,2	1,1	35,4	14,0	25,3
	SCW ₂	0,30	19,0	1,3	32,7	16,4	30,6
	SCW ₃	0,24	17,8	0,9	34,7	14,9	31,7
	SCW ₄	0,19	20,7	1,0	34,3	13,5	30,5
	SCW ₅	0,18	23,9	0,7	32,3	16,5	26,6
	SCW ₆	0,13	20,6	0,9	30,5	16,4	31,6
	SHW ₁	3,17	15,6	1,4	31,8	12,1	39,4
	SHW ₂	1,28	14,3	1,6	28,6	33,1	22,4
	SHW ₃	0,97	14,4	7,9	30,0	24,6	23,1
	SHW ₄	0,65	12,6	12,3	29,5	23,3	22,3
	SHW ₅	0,48	10,4	15,2	27,3	24,0	23,1
	SHW ₆	0,34	7,9	18,6	26,7	22,0	24,8

(1) Rendimento em relação ao peso seco do líquen.

(2) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(3) Confirmado pelos fragmentos de massa *m/z* 130 e 190 após redução com NaB²H₄.

Devido a heterogeneidade apresentada pela fração SCW-La (Figura 14A), esta foi submetida ao processo de purificação por precipitação com solução de Fehling, mas não houve formação de complexo. Em seguida, a mesma foi submetida à diálise em membranas com limite de exclusão de 16 kDa, resultando em uma fração retida (16RSC-La) e outra eluída (16ESC-La) (Figura 14B). Devido ao perfil de eluição heterogêneo apresentado pela fração 16ESC-La, a mesma foi dialisada em membrana com *cut off* 14 kDa, fornecendo as frações 14RSC-La (retida) e 14ESC-La (eluída), as quais mostraram-se homogêneas por HPSEC-MALLS (Figura 15A e B, respectivamente).

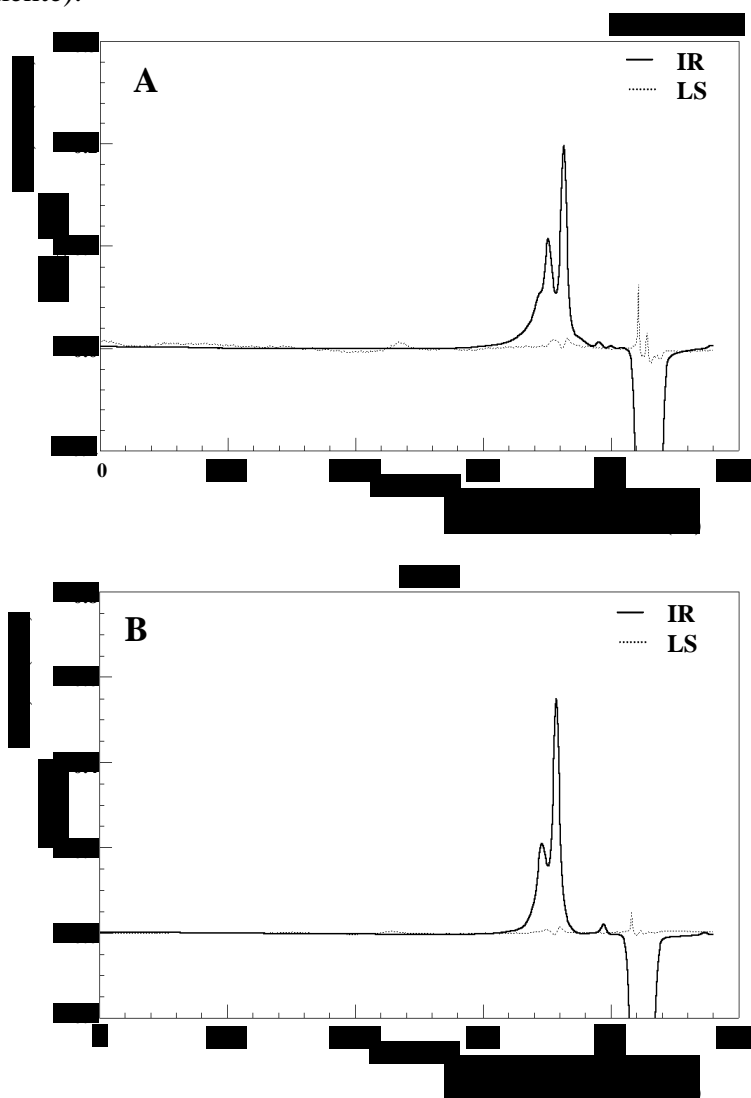


FIGURA 14 – Perfil de eluição das frações SCW-La (A) e 16ESC-La (B) (solubilizadas em H₂O MilliQ) em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS).

As frações 14RSC-La e 14ESC-La apresentaram-se similares quanto à sua composição monossacarídica (Tabela 12) e análise de RMN- ^{13}C (Figura 15A e B, respectivamente).

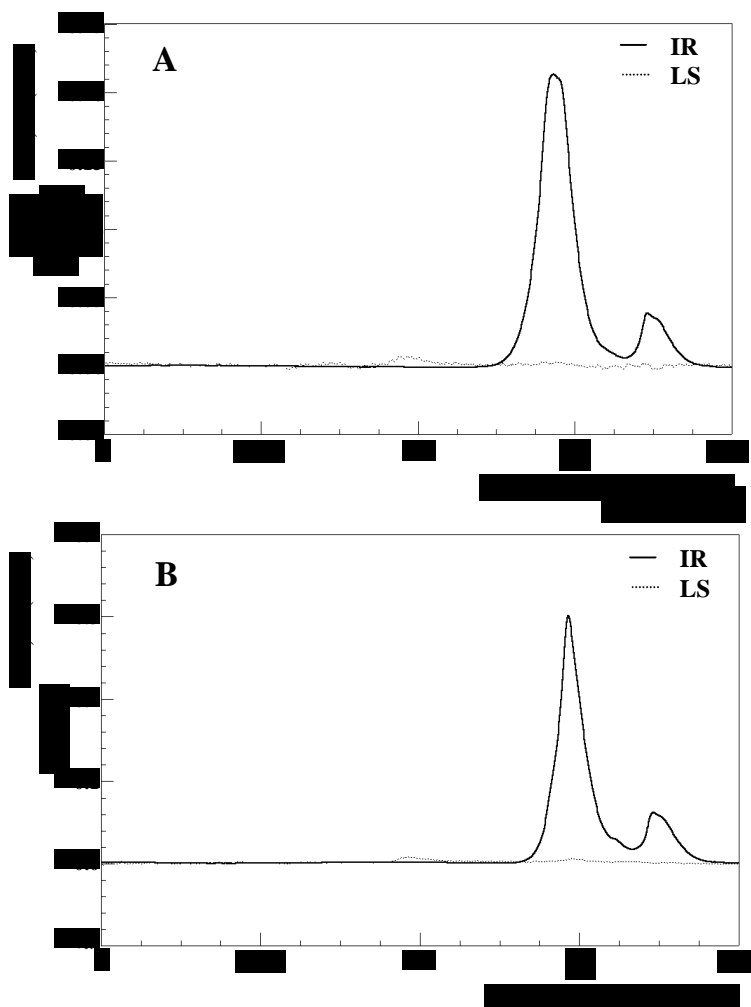


FIGURA 15 – Perfil de eluição das frações 14RSC-La (A) e 14ESC-La (B) (solubilizadas em nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, contendo azida sódica) em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS).

Os espectros de RMN- ^{13}C das frações 14RSC-La e 14ESC-La apresentaram sinais na região anomérica referentes a unidades piranosídicas (δ 103.9 - 95.6) e β -furanosídicas (δ 107.1). O sinal intenso em campo alto em δ 19.8, sugere a presença de

grupamentos acetil (referente ao $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), mas esta hipótese foi descartada devido à resistência do mesmo após o tratamento alcalino (KOH 1 M sob refluxo em banho com H_2O fervente, por 2 h). O sinal em δ 175.1 refere-se ao grupamento $-\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{H}$, sugerindo a presença de grupamentos ácidos na estrutura. Estes dados foram confirmados pela dosagem de ácidos urônicos a qual foi de 24,0% e 28,5% para *L. azureum* e *Leptogium* sp., respectivamente.

TABELA 12 - Composição monossacarídica das frações obtidas de *Leptogium* spp.

Frações	Monossacarídeos (mol%) ⁽¹⁾				
	Xyl	Man	3- <i>O</i> -MeGal ⁽²⁾	Gal	Glc
16ESC-La	26,4	11,7	0,8	32,1	29,0
14ESC-La	30,6	8,0	-	31,4	30,0
14RSC-La	22,3	16,3	-	27,9	33,5
PFHW-La	21,0	20,9	tr ⁽³⁾	39,6	18,5
PFHW-L2	15,6	tr ⁽³⁾	31,8	11,8	40,8

(1) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

(2) Confirmado pelos fragmentos de massa m/z 130 e 190 do acetato de 3-*O*-metilgalactitol-1-d.

(3) Traços.

O material hidrolisado das referidas frações quando analisado por HPLC, mostrou um pico, com tempo de retenção de 7,77 min, não identificado, além daqueles correspondentes aos monossacarídeos detectados por GC-MS (Tabela 12).

Devido ao baixo rendimento destas frações e pela presença deste composto nas amostras obtidas por extrações aquosas a quente, o isolamento e o estudo dos mesmos serão discutidos a seguir.

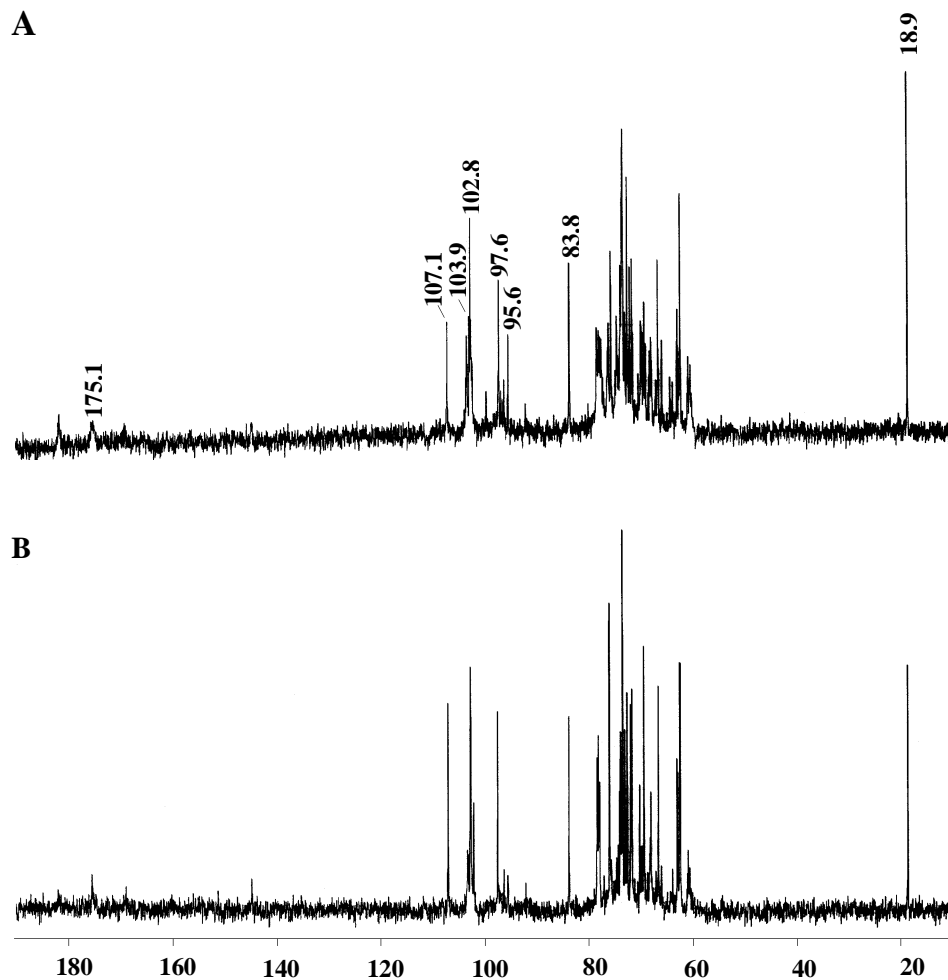


FIGURA 16 - Espectros de RMN- ^{13}C das frações 14RSC-La (A) e 14ESC-La (B) em D_2O (30°C) obtidas de *L. azureum*.

As frações sobrenadante de gelo/degelo obtidas a partir das extrações aquosas a quente para as duas espécies em estudo (SHW-La e SHM-L2) foram submetidas à purificação com solução de Fehling, resultando em precipitados (PFHW-La e PFHW-L2) e sobrenadantes (SFHW-La e SFHW-L2).

Os precipitados obtidos (PFHW-La e PFHW-L2) apresentaram-se homogêneos, por HPSEC (Figuras 17A e B, respectivamente).

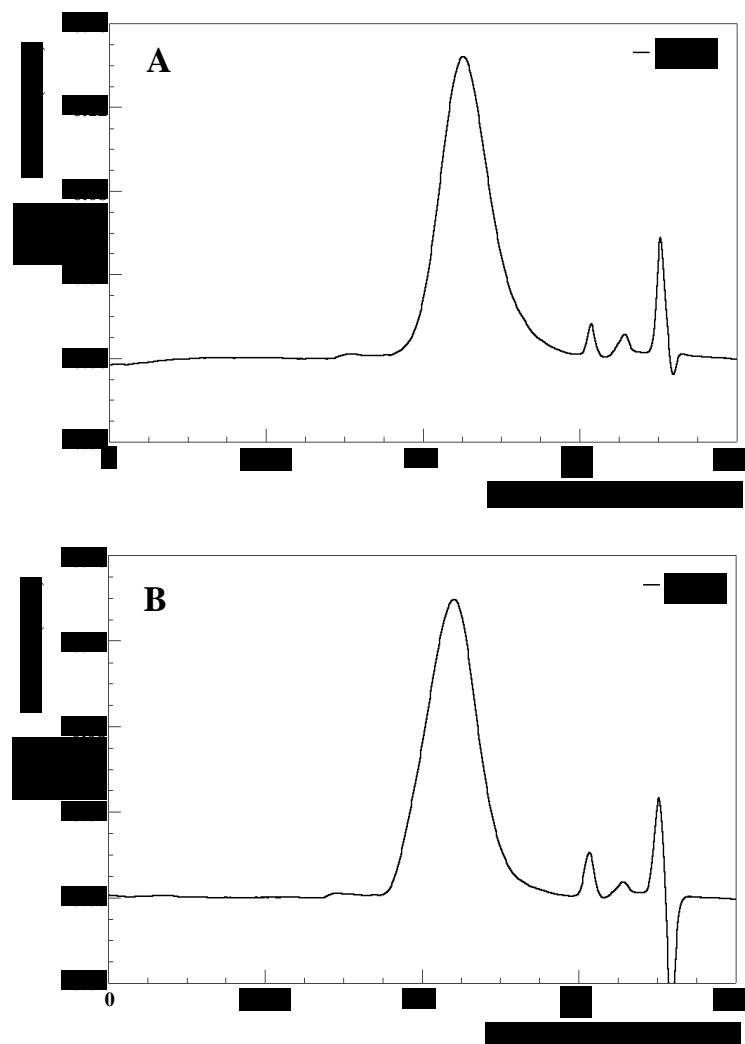


FIGURA 17 – Perfil de eluição, por HPSEC, das frações PFHW-La (A) e PFHW-L2 (B) (solubilizadas em nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, contendo azida sódica).

A fração PFHW-La, quando analisada por GC-MS, apresentou xilose, manose, galactose e glucose como principais monossacarídeos enquanto que PFHW-L2 mostrou ser composta por xilose, 3-*O*-MeGal, galactose e glucose (Tabela 12).

Os espectros de RMN- ^{13}C das frações PFHW-L2 e PFHW-La mostraram-se similares (Figuras 18A e 19, respectivamente). Os sinais observados na região anomérica correspondem a unidades na forma piranosídicas. Os sinais em δ 18.9 e 175.1 também foram observados nestas frações. A partir do espectro de RMN- ^{13}C -DEPT (Figura 18B) da fração PFHW-L2 foram observados os sinais invertidos em δ

69.0, 63.2 e 61.4 que correspondem a grupos $-\underline{\text{CH}}_2$. O sinal em δ 57.8 observado no espectro de RMN- ^{13}C e DEPT da fração PFHW-L2 refere-se aos $\text{O}\underline{\text{CH}}_3$ das unidades de 3-*O*-MeGalp, confirmando os dados observados por GC-MS.

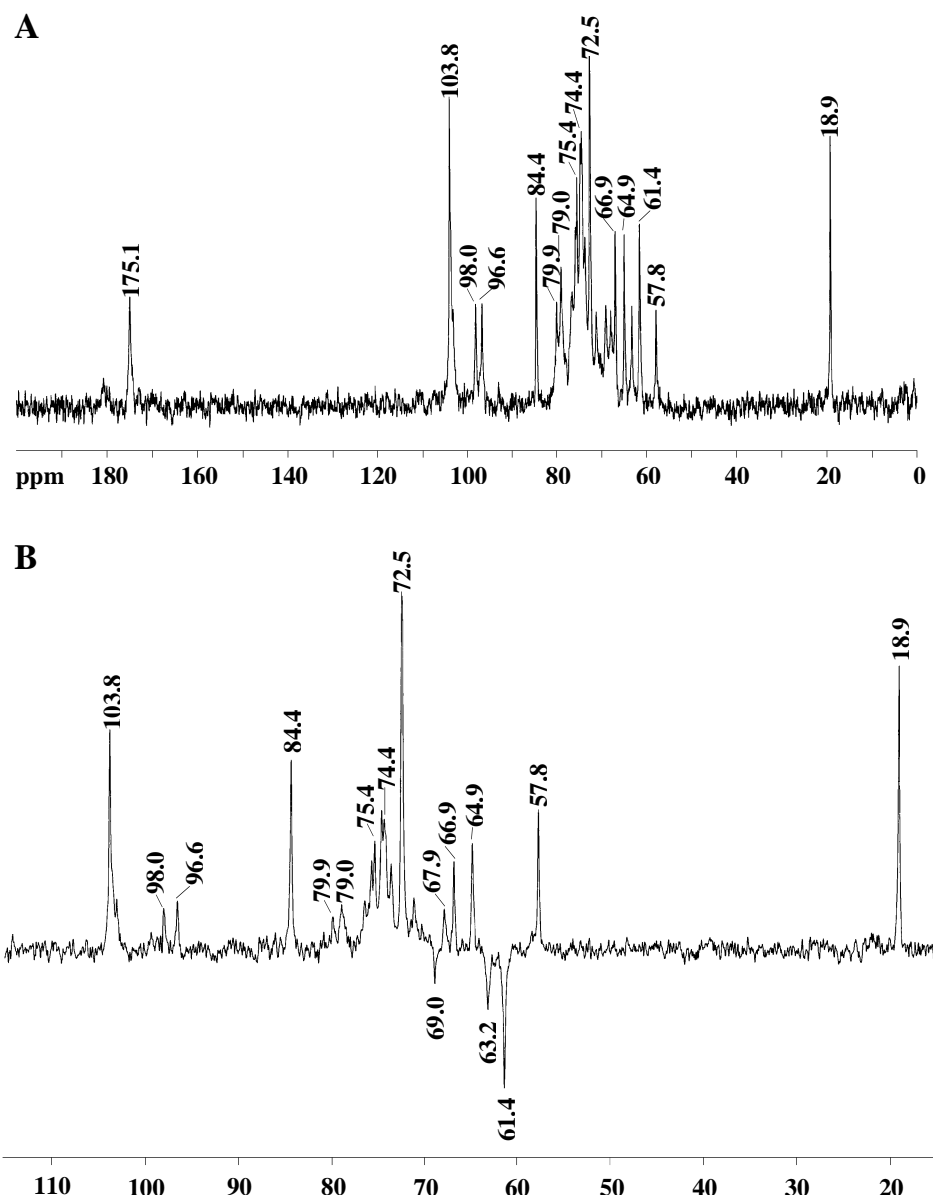


FIGURA 18 - Espectros de RMN- ^{13}C (A) e DEPT (B) da fração PFHW-L2 em D_2O (30°C).

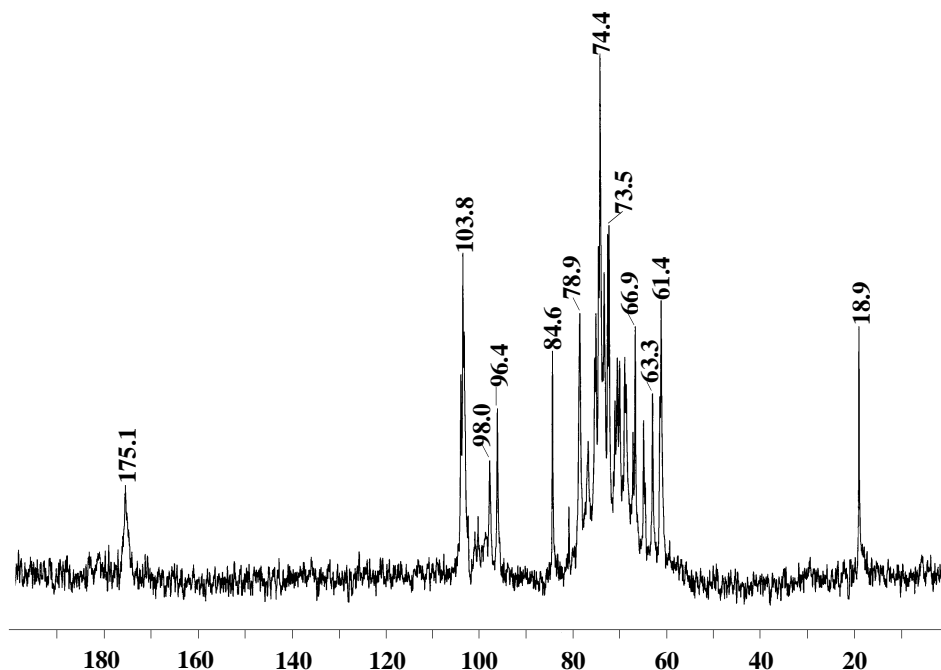


FIGURA 19 - Espectro de RMN- ^{13}C da fração PFHW-La em D_2O (30°C).

As frações PFHW-L2 e PFHW-La foram submetidas à dosagem de ácidos urônicos (FILISETTI-COZZI; CARPITA, 1991), apresentando um teor de 29,0% para as duas espécies.

Devido à presença de grupamentos ácidos na estrutura, a fração PFHW-L2 foi submetida ao processo de carboxi-redução pelo método de TAYLOR e CONRAD (1972), resultando a fração PFHW-CR, que após dosagem apresentou apenas 1% de grupamentos ácidos.

Na análise da composição monossacarídica de PFHW-CR foi detectado, além dos monossacarídeos observados na fração original (xilose, 20,7%; 3-*O*-MeGal, 23,7%; galactose, 11,8% e glucose, 36,1%), um outro pico (7,7%; principais fragmentos de massa m/z 81, 98, 109, 115, 127, 157 e 169) sugerindo que o

monossacarídeo ácido foi reduzido ao seu correspondente açúcar neutro, o qual não corresponde aos açúcares padrões.

Na tentativa de determinar a estrutura deste composto, o mesmo foi isolado por HPLC a partir da hidrólise total da fração PFHW-L2.

O espectro de RMN-¹³C da fração isolada (P1-L2) (Figura 20) manteve alguns sinais observados anteriormente para o polissacarídeo original, como os sinais em δ 175.1 e 18.9. O sinal em δ 84.6, que no espectro do polissacarídeo nativo sugeria ligação glicosídica do tipo (1 \rightarrow 3), também está presente no espectro de P1-L2 sugerindo que este sinal seja referente a presença de um substituinte em C-3. O possível substituinte trata-se de um grupamento carboxil. De acordo com os dados obtidos por SPELLMAN et al. (1983), os quais isolaram e caracterizaram o composto denominado ácido acérico (AceA) que corresponde a 3-C-carboxil-5-desoxi-L-xilose, esta estrutura apresenta C-3 deslocado para campo baixo. Este composto foi identificado como um componente da parede celular de plantas, sendo constituinte das ramnogalacturonanas II isoladas de *Acer pseudoplatanus*. Ao contrário do ácido acérico, o composto isolado em estudo apresenta-se como uma hexose. Além disso, não foi observado nenhum sinal correspondente a grupos $\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$ em concordância com a estrutura proposta.

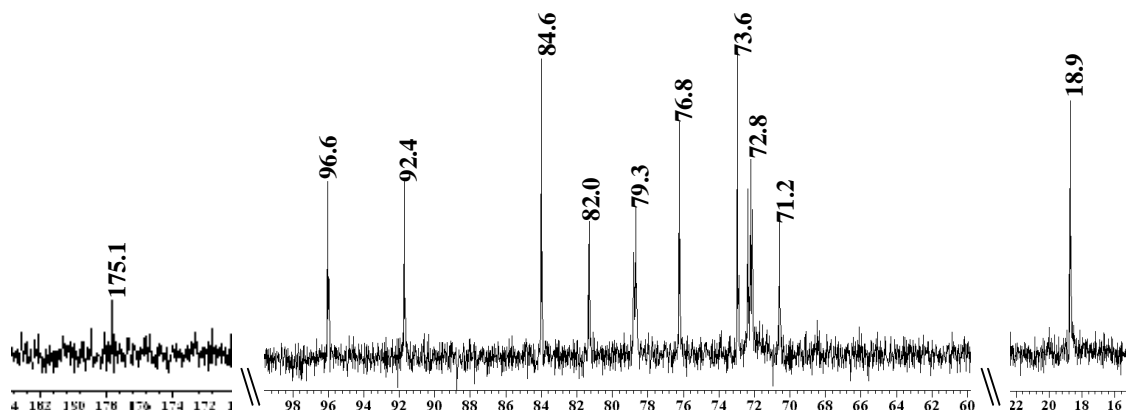


FIGURA 20 - Espectro de RMN- ^{13}C da fração P1-L2 em D_2O (30°C).

De acordo com os dados obtidos, o referido composto apresenta grupamentos metil ($-\text{CH}_3$) e carboxil ($-\text{COOH}$). Estes provavelmente estão ligados ao C-5 e C-3, respectivamente.

Considerando os resultados obtidos, o referido composto pode corresponder ao 3-C-carboxi-6-desoxi-hexose. Mas, análises adicionais deverão ser realizadas para a elucidação do tipo de hexose, bem como, da configuração enantiomérica.

Embora as frações obtidas por extrações aquosas a frio e a quente apresentarem composições monossacarídicas similares e o referido composto, provavelmente estas não apresentam a mesma estrutura, pois comportam-se de maneira diferente quando tratadas com solução de Fehling.

4.3.2 Polissacarídeos Obtidos por Extração Alcalina

O extrato alcalino obtido (K-La e K-L2) foi submetido ao processo de gelo e degelo resultando em um sobrenadante (SK-La e SK-L2) e um precipitado (PK-La e PK-L2).

As frações PK-La e PK-L2 foram analisadas por GC-MS e apresentaram glucose (~97%) como principal monossacarídeo. Estas foram solubilizadas em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ e analisadas por RMN- ^{13}C , apresentam-se idênticas àquelas obtidas por extrações aquosas (Figura 13).

À fração sobrenadante de gelo/degelo (SK-La e SK-L2) foi adicionado o reativo de Fehling, originando um precipitado (PFSK-La e PFSK-L2) e um sobrenadante (SFSK-La e SFSK-L2).

4.3.2.1 Caracterização estrutural da fração precipitado de Fehling (PFSK-La; galactomanana)

O precipitado obtido após precipitação com o reativo de Fehling (PFSK-La; 2,8 g%), contém xilose, manose, galactose e glucose em uma relação molar de 1:11:3:2. Este mostrou-se heterogêneo quando analisado por HPSEC-MALLS, com dois picos principais (Figura 21). Com a finalidade de purificação, esta fração foi dialisada, contra água destilada, em membranas com limite de exclusão de 16 kDa fornecendo 2 frações: retida (RPF-La, 2,3 g%) e eluída (EPF-La, 0,4 g%). A fração RPF-La apresentou-se homogênea quando analisada por HPSEC (Figura 21) e M_w $4,6 \times 10^5$ ($dn/dc = 0,150$), e composta por manose e galactose em uma relação molar de 5:1.

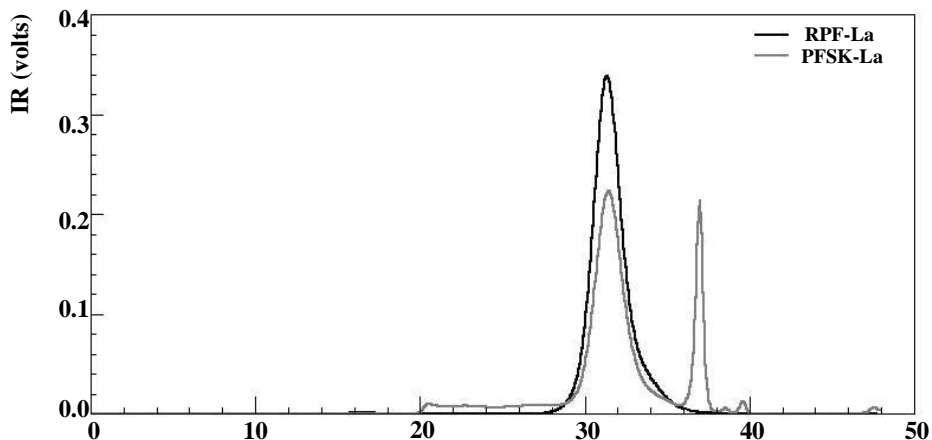


FIGURA 21 – Perfil de eluição, por HPSEC, das frações PFSK-La (em cinza) e RPF-La (em preto) (solubilizadas em H₂O MilliQ).

Os resultados obtidos por análise de metilação (Tabela 13) indicaram a presença de um polissacarídeo altamente ramificado, contendo grupos terminais não redutores de *Manp* (29,0%) e *Galp* (17,2%), além de unidades de *Manp* 2,6 di-*O*-substituídas (32,6%) e 2,4,6-tri-*O*-substituídas (4,5%).

Dados obtidos pela degradação de Smith mostraram altos teores de glicerol (87%) que são referentes aos grupos terminais não redutores de *Manp* e *Galp*, bem como unidades de *Manp* 2-*O*-, 6-*O*- e 2,6 di-*O*-substituídas. A produção de eritritol (8%) é devido a unidades 4-*O*-substituídas enquanto que o manitol (5,0%) refere-se as unidades de *Manp* 2,4,6-tri-*O*-substituídas. Estes dados juntamente com aqueles obtidos por metilação estão de acordo na determinação da estrutura deste polissacarídeo.

TABELA 13 - Análise por metilação da galactomanana obtida de *L. azureum*

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ⁽¹⁾	mol%	Tipo de ligação ⁽²⁾
2,3,4,6-Me ₄ Man	29,0	Manp-(1→
2,3,4,6-Me ₄ Gal	17,2	Galp-(1→
3,4,6-Me ₃ Man	3,3	2→)-Manp-(1→
2,3,6-Me ₃ Man	6,0	4→)-Manp-(1→
2,3,4-Me ₃ Man	7,4	6→)-Manp-(1→
3,4-Me ₂ Man	32,6	2,6→)-Manp-(1→
3-MeMan	4,5	2,4,6→)-Manp-(1→

(1) Analisado em GC-MS após metilação, metanólise, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) Baseado no derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

O espectro de RMN-¹³C da galactomanana (RPF-La; Figura 22) contém sinais na região de C-1 em δ 104.7, 103.5/103.2, 100.5 e 99.6, os quais correspondem aos grupos terminais não redutores de β -D-Galp, α -D-Manp-(1→2)- α -Manp, unidades de α -D-Manp da cadeia principal 6-*O*- e 2,6-di-*O*-substituídas, respectivamente (GORIN; IACOMINI, 1985; PRADO et al., 1999). A configuração glicosídica (α e β) foi determinada pelos deslocamentos de ¹H (HMQC: Figura 23) e constantes de acoplamento ($J_{C1,H1}$) observadas no espectro de RMN-¹³C acoplado (PERLIN; CASU, 1969). O terminal não redutor de Galp apresenta uma configuração do tipo β em virtude do sinal de H-1 em campo alto em δ 4.42 (104.7), o qual está de acordo com o valor $J_{C-1,H-1}$ de 158.9 Hz. Os sinais de H-1 em campo baixo a δ 5.07 (103.5 e 103.2; $J_{C-1,H-1} = 170.5$), 5.16 (100.5) e 5.11 (99.6; $J_{C-1,H-1} = 174.4$ Hz) indica que as unidades de Manp tem uma configuração glicosídica do tipo α , de acordo com os típicos sinais de C-1 em campo alto no espectro de RMN-¹³C e os valores de $J_{C-1,H-1}$ obtidos.

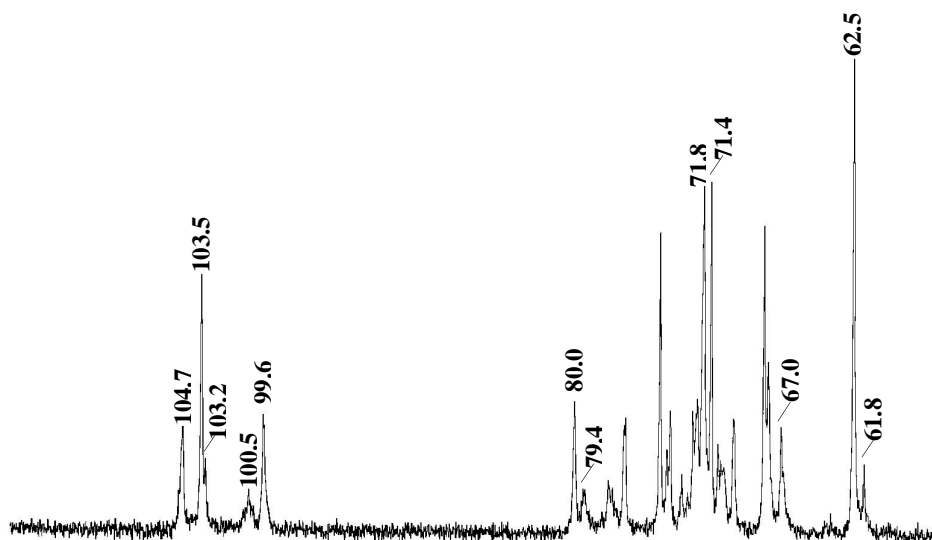


FIGURA 22 - Espectro de RMN- ^{13}C da galactomanana (RPF) isolada de *L. azureum* (em D_2O , 50°C).

Através das análises de HMQC (Figura 23), COSY e RMN- ^{13}C -DEPT da fração RPF-La foram obtidas informações referente aos tipos de ligações. O sinal invertido no espectro tipo DEPT o qual aparece como um duplete no HMQC em δ 67.0 com H-6 em 4.02 e H-6' em 3.70 sugere a presença de grupos $-\text{CH}_2$ substituídos referente as unidades de $\alpha\text{-Manp}$, de acordo com a análise de metilação (3,4- $\text{Me}_2\text{-Man}$, 32,6%). Os C-6's não substituídos aparecem como um duplete em 62.5 (3.89; 3.79) e com sinal em 61.8/3.89 dos terminais não redutores de $\alpha\text{-Manp}$ e $\beta\text{-Galp}$. Estes foram confirmados pela presença dos sinais de $-\text{CH}_2$ invertidos em 62.5 e 61.8 ppm na análise tipo DEPT. O espectro de COSY apresentou acoplamento de 5 prótons anoméricos (H-1) com seus respectivos H-2. Somente o sinal de H-2 em δ 3.59 (C-2, δ 71.8) mostrou acoplamento com o sinal em δ 4.42, H-1 de unidades de $\beta\text{-Galp}$ (GORIN; MAZUREK, 1975).

Similarmente, H-1 dos grupos terminais não redutores de $\alpha\text{-Manp}$ em δ 5.07 mostrou acoplamento com H-2 em δ 4.08 (HMQC: C-2, δ 71.4). O mesmo foi observado para os acoplamentos entre o sinal de H-1 em δ 5.11 e H-2 em δ 4.04 (HMQC: C-2, δ 80.0) correspondente aos grupos terminais não redutores de Manp os quais substituem na posição O-2 as unidades de Manp da cadeia principal (1 \rightarrow 6) ligada.

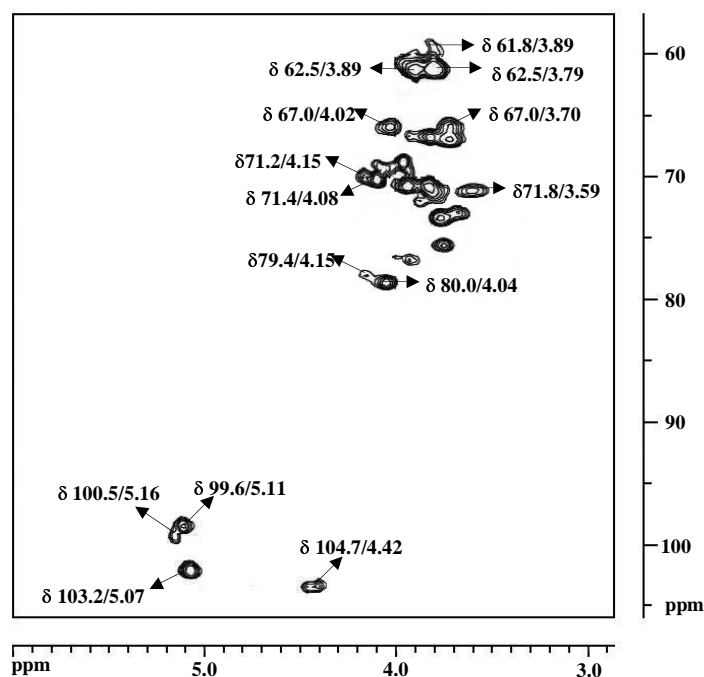


FIGURA 23 - Espectro de ^1H , ^{13}C HMQC da galactomanana isolada de *L. azureum* (em D_2O , 50°C).

O sinal pouco intenso em δ 79.4 (4.15), observado no HMQC, pode ser atribuído ao C-2 das unidades de Manp substituídas por grupos terminais não redutores de β -Galp. Como confirmação, o sinal de H-1 de β -Galp em δ 4.42 observado no espectro ROESY mostrou correlação com o sinal de H-2 referente as unidades de Manp ligadas (1 \rightarrow 6) e substituídas em O-2 (δ 4.15) da cadeia principal.

O sinal de H-1 em δ 5.16, o qual apresentou acoplamento com o sinal de H-2 em δ 4.15 (δ 71.2) (GORIN; MAZUREK, 1975), refere-se as unidades de Manp da cadeia principal não substituídas, estando de acordo com a presença do derivado parcialmente O-metilado 2,3,4-Me₃Manp (7,4%) observado na análise de metilação.

A partir dos dados obtidos concluiu-se que a galactomanana (fração RPF-La) apresenta uma cadeia principal composta por unidades α -D-Manp contendo ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 6), as quais encontram-se quase totalmente substituídas, preferencialmente, em O-2 por terminais não redutores de α -D-Manp e/ou β -D-Galp. Entretanto, galactomanana com alto nível de substituição e elevado teor de manose foi encontrado somente para o cianolíquen *Collema leptosporum* (PRADO et al., 1999),

sugerindo que estruturas similares podem ser típicas de fungos liquenizados da família Collemataceae.

4.4 Polissacarídeos de *Parmotrema* spp. e *Rimelia* spp.

Amostras de fungos liquenizados pertencentes aos gêneros *Parmotrema* (*P. austrosinense*, 41 g; *P. delicatulum*, 32 g; *P. schindlerii*, 35 g; *P. mantiqueirense*, 43 g e *P. tinctorum*, 60 g) e *Rimelia* (*R. cetrata*, 31 g e *R. reticulata*, 26 g) foram submetidos ao processo de purificação de acordo com a Figura 24.

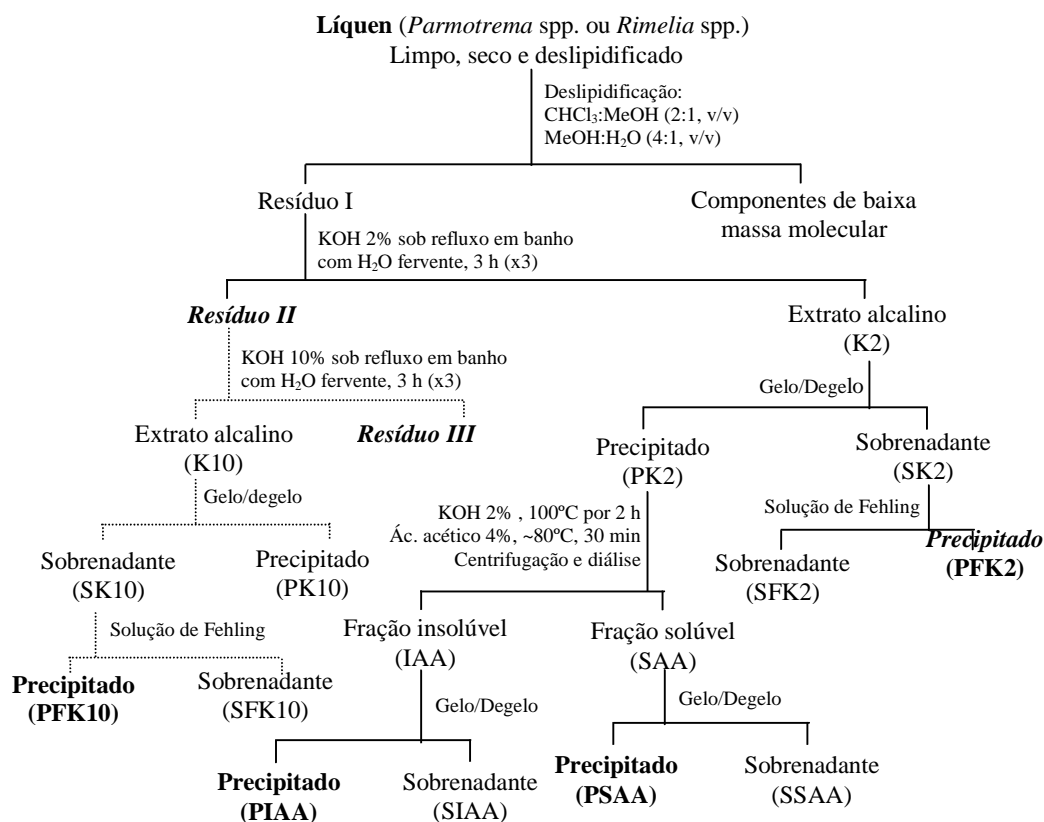


FIGURA 24 - Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos de fungos liquenizados do gênero *Parmotrema* e *Rimelia*¹

Após deslipidificação, por sucessivas extrações com CHCl₃-MeOH e MeOH-H₂O, cada resíduo foi então extraído com solução aquosa de KOH 2% sob refluxo em banho com H₂O fervente por 3 h (3x), neutralizado com HOAc, dialisado contra água

¹ A extração e purificação dos polissacarídeos extraídos com solução aquosa KOH 10%, sob refluxo em banho com H₂O fervente, foi realizada apenas para o líquen *Parmotrema mantiqueirense*.

corrente por 2 dias e liofilizado. Cada extrato foi então ressuspensionado em água e submetido ao processo de purificação por congelamento e degelo, resultando na formação de um precipitado (PK2) e um sobrenadante (SK2).

4.4.1 Liquefinações e nigerinas da Fração Precipitado de Congelamento-degelo (PK2)

Cada fração insolúvel em água fria (PK2) foi investigada quanto a sua composição monossacarídica e respectivos rendimentos. Todas as espécies estudadas apresentaram glucose como principal componente monossacarídico (~99%), indicando a presença de glucanas. Os rendimentos obtidos foram de 4-4,5% para todas as espécies estudadas.

Os espectros de RMN-¹³C obtidos para todas as espécies (Figura 25) foram similares e apresentaram 5 sinais na região anomérica, demonstrando uma mistura de glucanas. Com a finalidade de purificação, estas frações foram então submetidas a um similar tratamento alcalino (KOH 2% sob refluxo em banho com H₂O fervente por 2 h), dialisadas e então tratadas com HOAc 4% a ~80°C por 30 min. Este processo resultou na formação de uma fração insolúvel (IAA) e outra solúvel (SAA). IAA e SAA foram dialisadas e então submetidas a um novo processo de congelamento e degelo. O precipitado da fração IAA foi denominado PIAA enquanto que o da fração SAA foi PSAA (Figura 24).

Através deste procedimento, foi possível purificar a mistura de glucanas, onde a fração PIAA consiste de uma α -glucana, enquanto que a fração PSAA corresponde a uma β -glucana.

A fração PIAA obtida foi idêntica para todas as espécies estudadas (representada pelo espectro de RMN-¹³C de *R. cetrata*; Figura 26), correspondendo a uma α -D-glucana contendo, alternadamente, ligações glicosídicas do tipo (1→3)- e (1→4), previamente encontrada em *Cladonia* spp. (WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a) e *Cladina* spp. (IACOMINI et al., 1985; NISHIKAWA et al., 1974).

Espectros similares (RMN-¹³C) também foram observados para todas as frações PSAA (Figura 27). Neste caso, o sinal anomérico em δ 103.6 corresponde às

unidades 3-*O*-substituídas, enquanto que àqueles em δ 102.7 e 102.6 referem-se às unidades de β -Glc 4-*O*-substituídas.

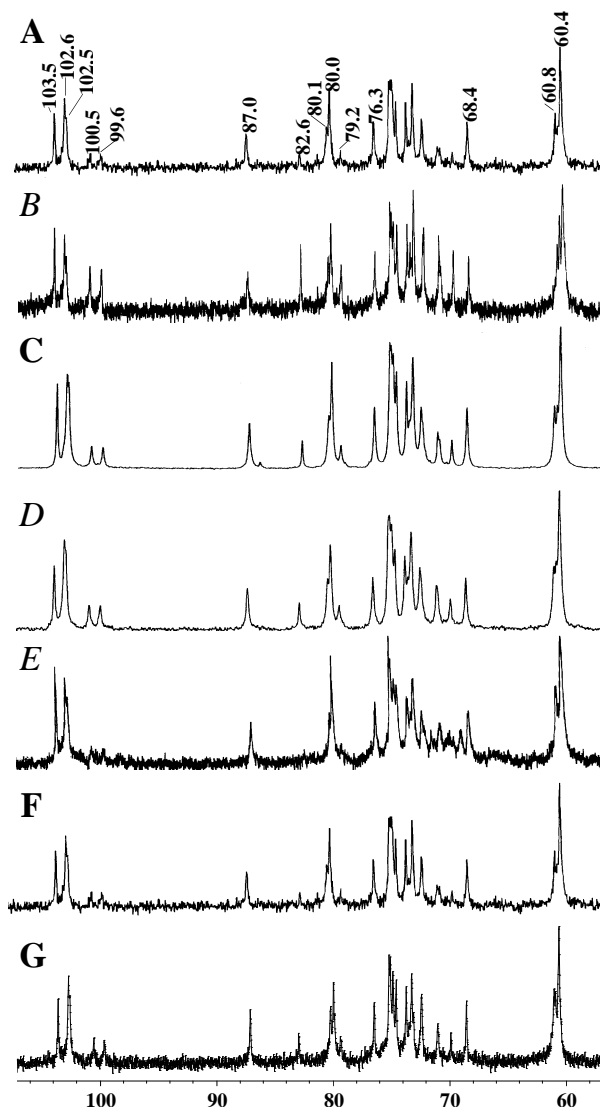


FIGURA 25 - Espectros de RMN- ^{13}C da fração precipitado de congelamento e degelo (PGD) obtida de *Parmotrema austrosinense* (A), *P. delicatulum* (B), *P. mantiqueirense* (C), *P.*

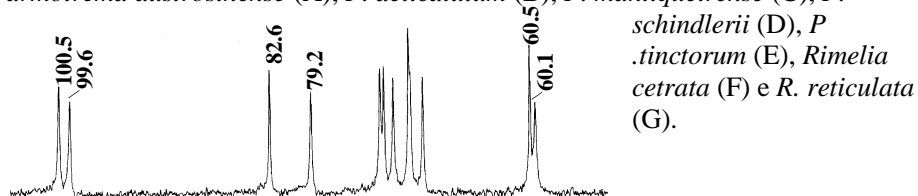


FIGURA 26 - Espectro de RMN- ^{13}C da fração PIAA (nigerana), em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 50°C , obtida de *Rimelia cetrata*.

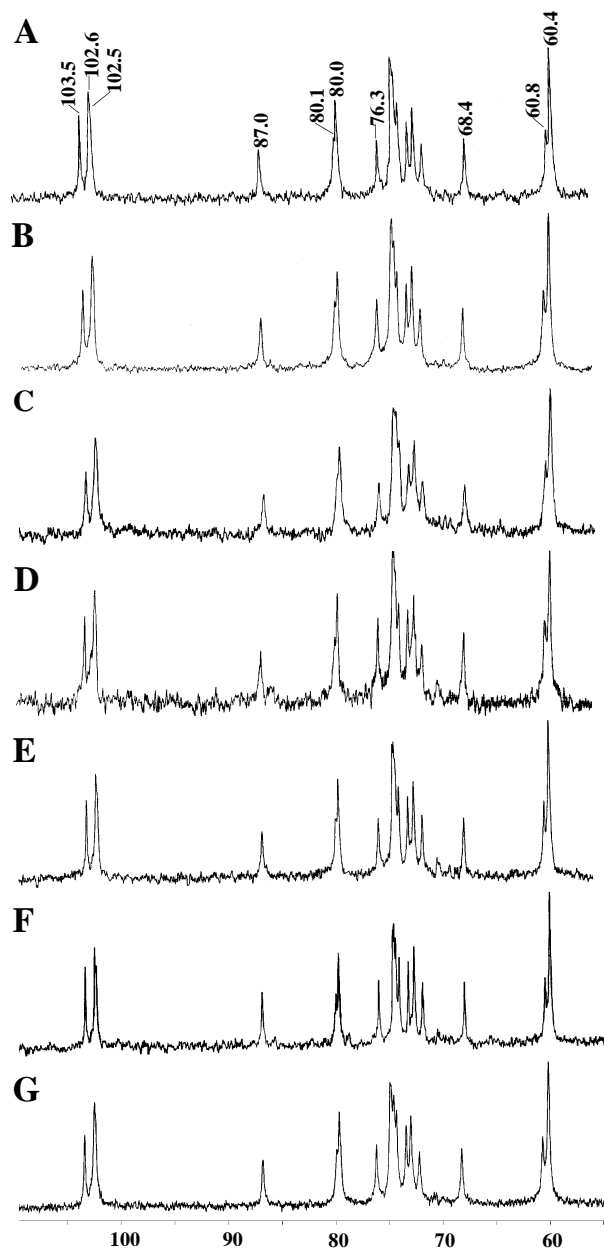


FIGURA 27 - Espectros de RMN- ^{13}C da fração PSAA (liquenanas) obtida de *Parmotrema austrosinense* (A), *P. delicatulum* (B), *P. mantiqueirense* (C), *P. schindlerii* (D), *P. tinctorum* (E), *Rimelia cetrata* (F) e *R. reticulata* (G).

A configuração glicosídica do tipo β - foi confirmada em virtude dos sinais de H-1 em campo alto em δ 4.38 e 4.28, referente às unidades de Glcp 3-*O*- e 4-*O*-substituídas, respectivamente, determinadas pelas suas áreas relativas.

Os sinais de ^{13}C desta β -glucana puderam ser assinalados com o auxílio dos espectros de laminarana e de celulose (GORIN, 1981). Os sinais em δ 80.1 e 80.0 são referentes ao C-4 das unidades de Glcp 4-*O*-substituídas, enquanto que aquele em δ 60.4 corresponde ao C-6 não substituído das mesmas unidades. Os sinais em δ 87.0, 76.3, 68.4 e 60.8 correspondem ao C-3, C-5, C-4 e C-6 não substituído das unidades 3-*O*-substituídas, respectivamente. A configuração β , junto com os sinais referentes às substituições em O-3 e O-4 demonstra a presença de liquenanas em todas as espécies estudadas.

Devido à similaridade observada nos espectros de RMN- ^{13}C da fração PSAA (β -glucana) obtida das espécies estudadas, somente aquela isolada de *P. austrosinense* foi submetida a análises adicionais. A integração das áreas correspondentes ao H-1 (δ 4.28 e 4.38) forneceu a proporção de ligações (1 \rightarrow 4)- (1 \rightarrow 3), no valor de 3.1:1. Esta relação está acordo com a proporção dos derivados parcialmente *O*-metilados, 2,3,6-Me₃Glc e 2,4,6-Me₃Glc, observados na análise de metilação.

A sequência de ligações desta β -glucana puderam ser determinada pelo procedimento de degradação de Smith controlada (ABDEL-AKHER et al., 1952; HAY et al., 1965). Com a glucana isolada de *P. austrosinense*, este procedimento forneceu os derivados 2-*O*- β -D-glucopiranosil-D-eritritol (9,6 min) e eritritol (13,1 min), detectado por HPLC e determinados por comparação com padrões (Figura 28 A, B e C, respectivamente), como descrito na seção Material e Métodos. A ausência de glucobiosil eritritol sugere que as unidades de Glcp 3-*O*-substituídas estão situadas entre aquelas 4-*O*-substituídas, com nenhuma ligação (1 \rightarrow 3)-consecutiva.

De acordo com os dados obtidos, as espécies estudadas dos gêneros *Parmotrema* e *Rimelia* contém α - e β -glucanas, correspondentes a nigerana e liquenana, respectivamente, sendo o teor de liquenana (~4,2 g%) superior ao da nigerana (~0,4 g%).

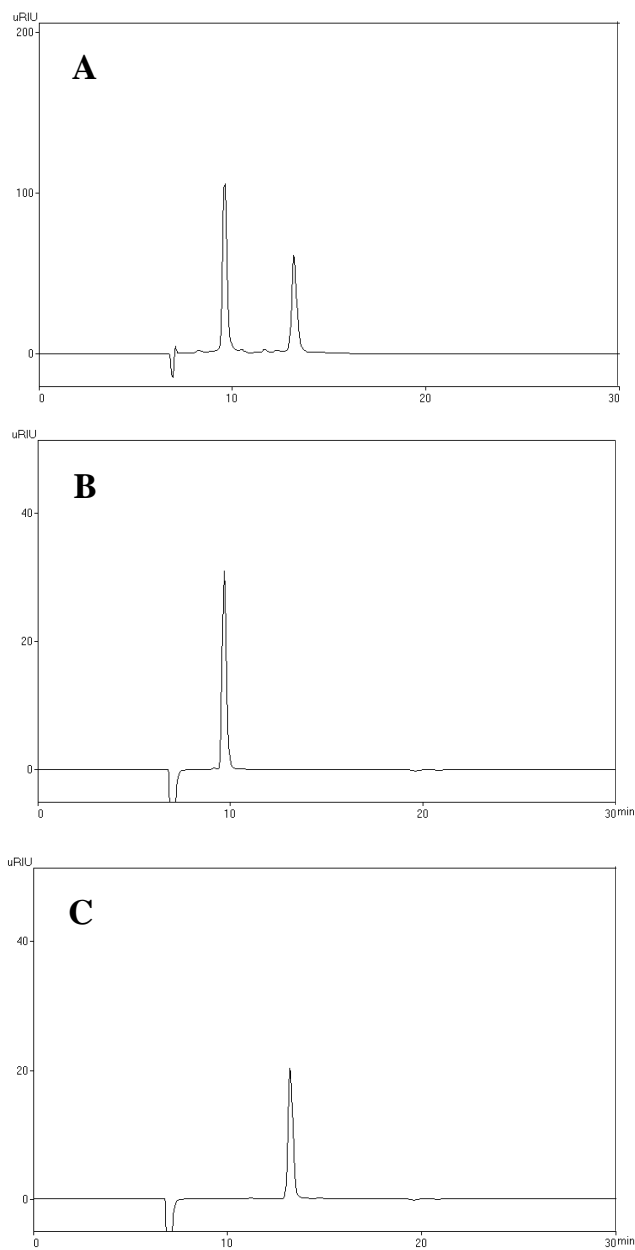


FIGURA 28 – Perfil de eluição da fração obtida após degradação de Smith de PSAA (A) e dos padrões: 2-*O*-β-D-glucopiranosil-D-eritritol (B) e eritritol (C), obtido por HPLC (coluna HPX-87H 300 x 780 mm - AMINEX® ion exclusion-BIO RAD).

As nigeranas, com relação molar de 1:1, são polissacarídeos, amplamente conhecidos em líquens, como espécies de *Cladonia* (WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a), *Ramalina* (STUELP et al., 1999; CORDEIRO et al., 2003) entre outras. WORANOVICZ-BARREIRA et al, (1999a) sugeriu que as nigeranas podem ser

utilizadas como marcadores quimiotaxonômicos em *Cladonia* spp. Na família Parmeliaceae, elas tem sido descritas em *Letharia vulpina* (IACOMINI et al., 1988) e algumas espécies de *Parmelia* s. lat. (SHIBATA, 1973) entre outras.

Liquenanas têm sido caracterizadas de diversas espécies de fungos liquenizados, porém diferentes das nigeranas, havendo uma variação na relação de ligações (1→3)-, (1→4) dependendo do gênero e/ou espécie. Embora esta relação seja constante entre algumas espécies de Parmeliaceae, como *Cetraria islandica* (3:7) (MEYER; GÜRTLER, 1947a), *C. richardsonii* (3:7) (YOKOTA et al., 1979) e *Usnea rubescens* (3:7) (NISHIKAWA et al., 1974), em outras há diferenças, como em uma *Usnea* sp.(1:3) (IACOMINI et al., 1988). Espécies do gênero *Parmelia* s. lat. também são conhecidas por conterem liquenanas (SHIBATA, 1973), mas a proporção entre as ligações não é conhecida.

OLAFSDOTTIR e INGÓLFSDOTTIR (2001) sugerem que alguns polissacarídeos de fungos liquenizados apresentam importância taxonômica com relação à família uma vez que eles são amplamente distribuídos da seguinte maneira: a pustulana é característica para Umbilicariaceae, a nigerana para Cladoniaceae e a liquenana para Parmeliaceae. Em Parmeliaceae, o gênero *Parmotrema* é conhecido por ter uma liquenana tipo *Cetraria* (*Cetraria*-type) (3:7) na parede celular, enquanto que o gênero *Rimelia*, o qual foi segregado, contém uma liquenana tipo intermediária (*intermediate-type*) (COMMON, 1991; ELIX, 1994). Outra importante diferença, de acordo com os liquenologistas, em polissacarídeos de Parmeliaceae refere-se as reações com iodo. O gênero *Parmotrema* é conhecido por apresentar coloração no talo líquênico, enquanto que o gênero segregado, *Rimelia*, não apresenta a mesma resposta. Estas diferenças são atribuídas à presença de diferentes glucanas.

Os resultados obtidos mostraram que os líquens dos gêneros *Parmotrema* e *Rimelia* (*P. austrosinense*, *P. delicatulum*, *P. schindlerii*, *P. mantiqueirense*, *P. tinctorum*, *R. cetrata* e *R. reticulata*) contém nigeranas e liquenanas as quais foram idênticas para todas as espécies. As liquenanas isoladas apresentaram uma proporção de ligação de 3.1:1, confirmada por análise de metilação e RMN-¹H. Estudo anterior com *Rimelia cetrata* (conhecido anteriormente como *Parmotrema cetratum*), mostrou

uma relação de 2:1 (CORRADI da SILVA; GORIN; IACOMINI, 1993), sendo esta diferença atribuída à presença de contaminantes na amostra, uma vez que os autores citaram que o procedimento de fracionamento não foi totalmente efetivo.

Os resultados obtidos junto com os dados das análises de DNA (CRESPO; CUBERO, 1998; LOUWHOF; CRISP, 2000) devem ser considerados para reavaliar a segregação do gênero *Rimelia*.

4.4.2 Galactoglucomananas da Fração Precipitado de Fehling (PFK2)

Como observado na Figura 24, o sobrenadante de gelo/degelo obtido a partir da extração com solução aquosa de KOH 2%, para todas as espécies em estudo, foi submetido ao processo de purificação por precipitação com solução de Fehling, resultando na formação de um precipitado (PFK2) e um sobrenadante (SFK2). Como podemos observar (Tabela 14) todas as frações PFK2 mostraram-se similares contendo manose, galactose e glucose como componente monossacarídico.

TABELA 14 - Composição monossacarídica e rendimento da fração PFK2 obtida dos líquens *Parmotrema* spp. e *Rimelia* spp.

Fungo liquenizado	Rendimento (g%) ⁽¹⁾	Monossacarídeos ⁽²⁾		
		Man	Gal	Glc
<i>Parmotrema austrosinense</i>	6.7	51	44	5
<i>P. delicatulum</i>	3.8	49	44	6
<i>P. mantiqueirense</i>	5.6	51	43	6
<i>P. schindlerii</i>	3.2	50	43	7
<i>P. tinctorum</i>	5.4	52	42	6
<i>Rimelia cetrata</i>	3.4	53	40	7
<i>R. reticulata</i>	5.2	52	40	8

(1) Rendimento em relação ao peso seco do líquen.

(2) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

As mesmas apresentaram perfil de eluição homogêneo quando analisadas por HPSEC (Figura 29), com as seguintes massas molares ($dn/dc = 0,148$): *Parmotrema austrosinense*, $M_w 53,7 \times 10^3$; *P. delicatulum*, $68,2 \times 10^3$; *P. schindlerii*, $62,7 \times 10^3$; *P. mantiqueirense*, $64,5 \times 10^3$; *P. tinctorum*, $39,4 \times 10^3$; *Rimelia cetrata*, $38,5 \times 10^3$; *R. reticulata*, $59,7 \times 10^3$.

Baseado nos acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (Tabela 15), esta fração mostrou-se altamente ramificada, contendo altas proporções de terminais não redutores de *Galp*, além de pequenas porcentagens de *Manp*, *Galp* e *Glc**p*. Também foram observados os derivados 2,3,4-Me₃Man, 2,3-Me₂Man, 3,4-Me₂Man e 3-MeMan, correspondentes as unidades da cadeia principal. Esta é constituída por unidades de α -*Manp*-(1→6), substituídas em O-2, O-4 ou disubstituídas em O-2,4, além de, unidades não substituídas. Também foi observado, pequenas quantidades de unidades de *Manp* altamente substituídas. Substituições em O-2, O-3 e O-6 e di-substituições em O-2,3, O-2,4 e O-4,6 foram observadas para as unidades de *Galp*. As unidades de *Glc**p* apresentaram-se como terminais não redutores e 3-*O*-substituídas.

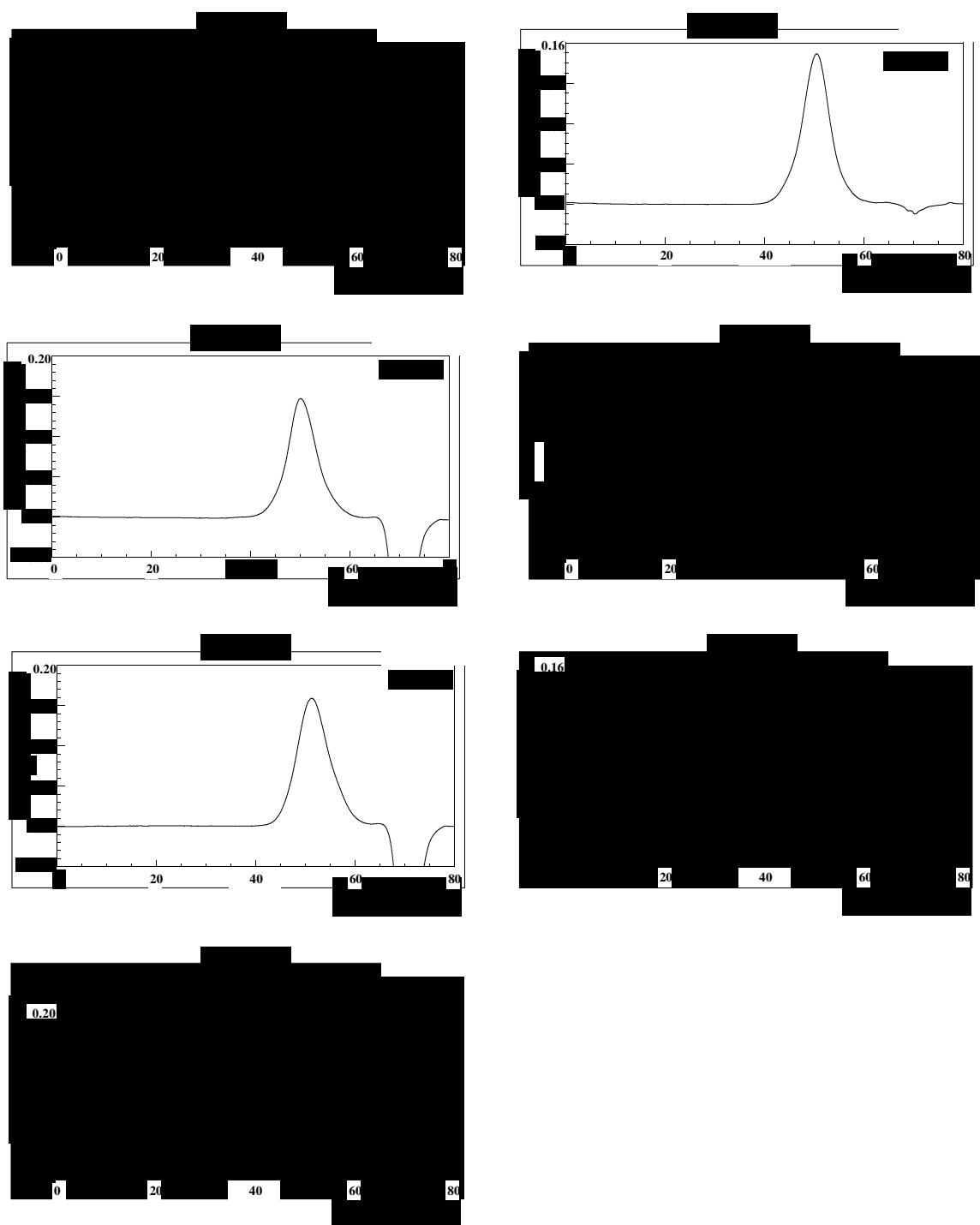


FIGURA 29 – Perfil de eluição, por HPSEC, das frações precipitado de Fehling (PFK2) obtida de *Parmotrema austrosinense* (PF-Pa), *P. delicatulum* (PF-Pd), *P. mantiqueirense* (PF-Pm), *P. schindlerii* (PF-Ps), *P. tinctorum* (PF-Pt), *Rimelia cetrata* (PF-Rc) e *R. reticulata* (PF-Rr) ⁽⁴⁾.

⁴ Os picos observados após ~65 ml são referentes aos solventes utilizados (nitrito de sódio 0,1 mol.l⁻¹, contendo azida sódica) ou H₂O MilliQ (inversão do pico).

TABELA 15 - Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PFK2; galactoglucomanana) obtidas de *Parmotrema* spp. e *Rimelia* spp.

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados (1)	<i>mol %</i>						
	Pa (2)	Pd	Pm	Ps	Pt	Rc	Rr
2,3,4,6-Me ₄ Man	1,1	0,9	0,9	1,3	1,3	1,0	0,9
2,3,4,6-Me ₄ Glc	1,6	1,4	3,1	2,4	1,7	3,8	4,1
2,3,5,6-Me ₄ Gal	-	0,6	0,5	0,7	0,2	0,3	0,7
2,3,4,6-Me ₄ Gal	40,0	40,3	39,6	39,7	39,2	38,4	38,1
2,4,6-Me ₃ Glc	3,3	3,6	2,5	3,8	3,2	4,1	3,9
2,4,6-Me ₃ Man	0,4	-	0,4	0,3	-	-	-
2,4,6-Me ₃ Gal	0,4	0,3	-	0,3	0,5	0,2	0,5
2,3,6-Me ₃ Man	0,2	0,1	-	0,4	0,9	-	-
3,4,6-Me ₃ Gal	-	-	1,7	-	-	1,3	1,7
2,3,4-Me ₃ Man	22,0	21,4	15,7	19,7	20,9	17,9	14,1
2,3,4-Me ₃ Gal	1,1	0,5	0,7	0,8	1,2	0,6	1,1
2,6-Me ₂ Man	0,2	0,2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,2
4,6-Me ₂ Gal	0,6	0,2	0,3	0,4	0,4	0,1	0,3
3,6-Me ₂ Gal	0,5	0,5	0,9	0,4	0,7	0,3	1,0
2,3-Me ₂ Man	1,9	4,4	3,8	3,6	2,4	6,2	6,5
3,4-Me ₂ Man	7,2	7,8	6,1	6,6	7,4	7,6	8,7
2,4-Me ₂ Man	0,2	0,2	0,1	-	0,4	-	-
2,3-Me ₂ Gal	0,4	0,1	0,2	-	0,4	0,3	0,4
2-MeMan	0,4	0,1	0,8	0,3	0,3	0,2	0,3
3-MeMan	18,1	16,4	19,3	18,4	18,3	17,1	16,8
Man	0,4	0,2	0,7	0,4	0,3	0,3	0,7

(1) Analisado em GC-MS (coluna DB-225) após metilação, metanólise, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) As siglas são: Pa (*P. austrosinense*), Pd (*P. delicatulum*), Pm (*P. mantiqueirense*), Ps (*P. schindlerii*), Pt (*P. tinctorum*), Rc (*R. cetrata*), Rr (*R. reticulata*).

Os espectros de RMN-¹³C da fração PFK2 obtida das espécies estudadas (Figura 30) apresentaram em comum os principais sinais, porém os sinais de pequena intensidade são típicos de cada espécie. Eles contêm sinais de C-1 correspondentes a terminais não redutores de β-D-Galp-(1→4)-α-D-Manp (δ 104.6), α-D-Galp-(1→2)-α-D-Manp (δ 102.8) (GORIN; IACOMINI, 1984, 1985), e de unidades de α-D-Manp da cadeia principal 6-*O*- (δ 101.6) e 2,6-di-*O*- e 2,4,6-tri-*O*-substituídas (δ 99.8) (GORIN; IACOMINI, 1985; GORIN, 1973). O sinal em δ 80.8 refere-se ao C-2 das unidades de Manp ligadas (1→6) e substituídas em O-2 da cadeia principal (CORRADI da SILVA; GORIN; IACOMINI, 1993).

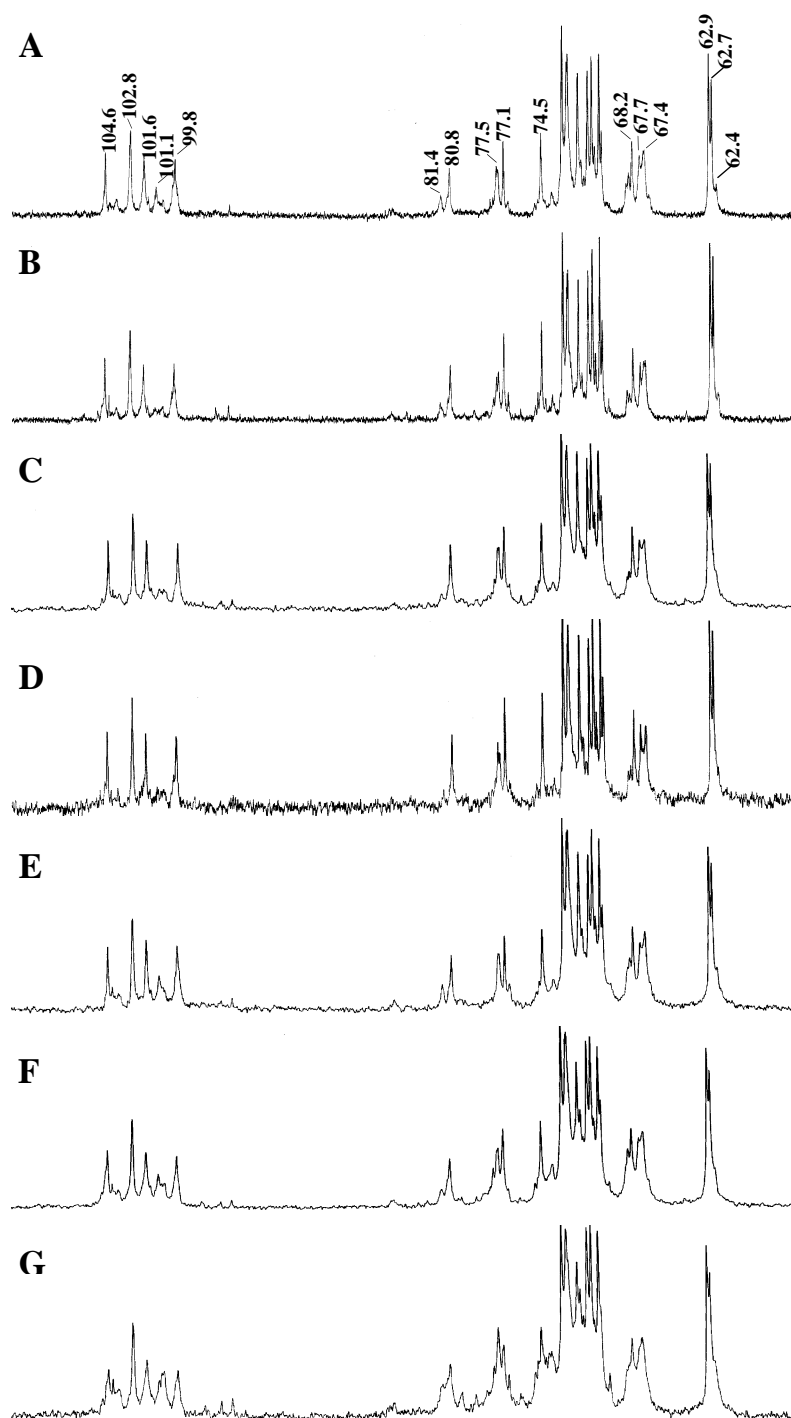


FIGURA 30 - Espectros de RMN- ^{13}C da fração precipitado de Fehling (PFK2; galactoglucomanana) obtida de *Parmotrema austrosinense* (A), *P. delicatulum* (B), *P. mantiqueirense* (C), *P. schindlerii* (D), *P. tinctorum* (E), *Rimelia cetrata* (F) e *R. reticulata* (G).

As configurações glicosídicas (α - e β -) foram determinadas através dos valores de H-1 observados no espectro de HSQC-DEPT da galactoglucomanana isolada de *P. austrosinense* (Figura 33). As unidades terminais não redutores de Galp apresentaram uma configuração glicosídica do tipo β devido o sinal de H-1 em campo alto em δ 4.42 (C-1: δ 104.6) além de configuração α decorrente do sinal de H-1 em campo baixo em δ 5.17 (102.8). Os sinais de H-1 em δ 4.98 (101.6) e 5.23 (99.8) indicaram que as unidades de Manp apresentam configuração tipo α .

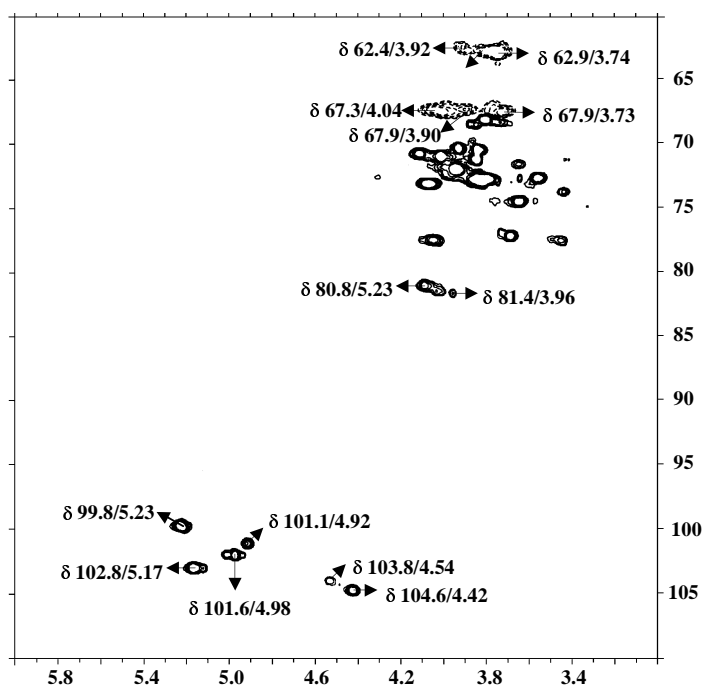


FIGURA 31 - Espectro de HSQC-DEPT do heteropolissacarídeo isolado de *Parmotrema austrosinense* (em D₂O a 30°C).

O espectro de HSQC-DEPT apresentou sinais invertidos em δ 67.9 e δ 67.3 referentes a grupos $-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ substituídos das unidades α -Manp da cadeia principal, estando de acordo com os derivados, 3-MeMan e 2,3,4-Me₃Man, observados na análise de metilação. Os sinais em δ 62.4 (3.92), δ 62.7 (3.78) e δ 62.9 (3.74) correspondem aos C-6's das unidades terminais não redutoras de Galp, Glcp e Manp.

De acordo com os dados apresentados, esta fração corresponde a galactoglucomanana sendo esta similar para os dois distintos gêneros, *Parmotrema* e

Rimelia, apresentando diferenças típicas das espécies. A mesma apresentou uma cadeia principal de unidades de α -D-manopiranosose ligadas (1 \rightarrow 6) sendo, na maioria, não substituídas e 2,4-di-*O*-substituídas por unidades de α -Galp e β -Gal, respectivamente.

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores com outras espécies destes gêneros (CORRADI da SILVA; GORIN; IACOMINI, 1993; TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1995), e indicam que a caracterização estrutural de polissacarídeos é útil como uma ferramenta adicional na classificação de fungos liquenizados.

4.4.3 β -Glucana (1 \rightarrow 6) da Fração Precipitado de Fehling (PFK10) de *P. mantiqueirens*

Conforme descrito anteriormente (Figura 24), o líquen *P. mantiqueirens* também foi submetido à extração com KOH 10% sob refluxo em banho com água fervente. Os polissacarídeos obtidos foram submetidos a purificação por congelamento e degelo. A fração solúvel em água fria (SK10) obtida foi tratada com reativo de Fehling, resultando na formação de um sobrenadante (SFK10) e um precipitado (PFK10).

A fração PFK10 (2,1 g%) apresentou glucose como principal componente monossacarídico e um perfil de eluição homogêneo, por HPSEC (Figura 32), com M_w $4,2 \times 10^5$ ($dn/dc = 0,141$).

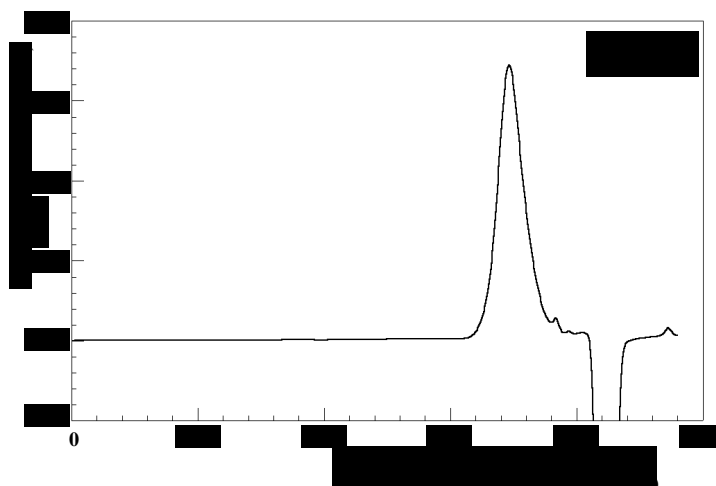


FIGURA 32 – Perfil de eluição, por HPSEC, da fração PFK10 (solubilizada em H₂O MilliQ), obtida do líquen *P. mantiqueirense*.

O espectro de RMN-¹³C (Figura 33) contém seis sinais, idêntico àqueles da β-glucana (1→6) (SASSAKI et al., 2002), denominada de pustulana.

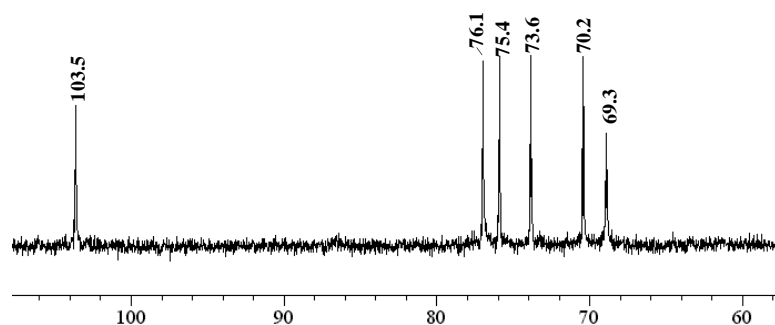


FIGURA 33 - Espectro de RMN-¹³C da fração PFK10 em D₂O (30°C).

A configuração glicosídica foi confirmada em decorrência do sinal de H-1 em campo alto em δ 4.51 (observado no espectro de RMN-¹H) e um sinal de C-1 em campo baixo em δ 103.5. O sinal em δ 69.3 de C-6 refere-se ao C-6 substituído, o qual foi confirmado pela inversão do sinal correspondente na análise RMN-¹³C-DEPT. Os sinais observados em δ 73.6, 76.1, 70.2 e 75.4 correspondem ao C-2, C-3, C-4 e C-5, respectivamente. Estes dados estão de acordo com a análise de metilação, a qual apresentou apenas os derivados 2,3,4,6-Me₄Glc_p (0,6%) e 2,3,4-Me₃Glc_p (99,4%).

De acordo com os dados apresentados, esta fração consiste em uma β -glucana (1 \rightarrow 6) linear, denominada de pustulana. Esta molécula, ao contrário da maioria das glucanas lineares, apresenta alta solubilidade em água.

4.5 Polissacarídeos de *Rocella decipiens*

Com a finalidade de remover os lipídeos, pigmentos e compostos hidrofóbicos, o talo líquênico (13 g) foi extraído sucessivamente com CHCl_3 -MeOH e MeOH- H_2O . O líquen deslipidificado foi então submetido a sucessivas extrações com H_2O e KOH 2% sob refluxo em banho com água fervente (Figura 34). Após neutralização (HOAc) os polissacarídeos extraídos (frações W e K, respectivamente) foram obtidos por precipitação com etanol. O rendimento da extração alcalina a quente foi de 8,1 g%, enquanto que a aquosa foi de apenas 2,5 g%.

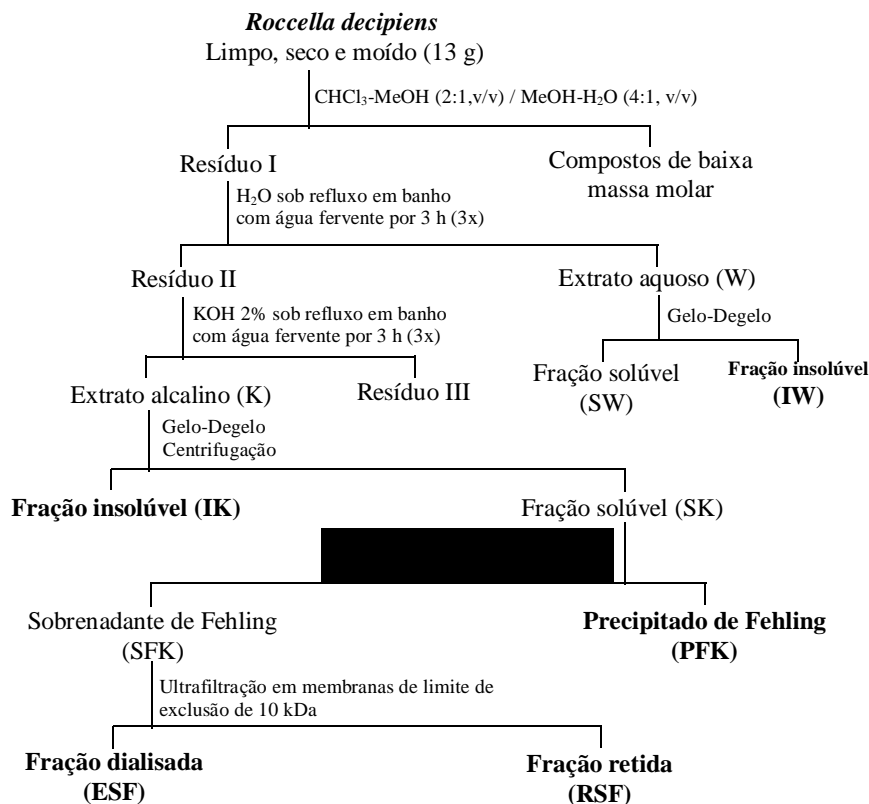


FIGURA 34 - Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos do líquen *Rocella decipiens*

As frações W e K foram ressuspensas em água destilada e submetidas ao fracionamento por congelamento e degelo. Este procedimento resultou em frações insolúveis (IW; 0,6 g% e IK; 1,7 g%, respectivamente) e solúveis (SW; 1,7 g% e SK; 5,4 g%) em água fria.

4.5.1 Laminaranas Presentes na Fração Insolúvel em Água Fria

As frações insolúveis em água fria (IW e IK), obtidas após processo por congelamento e degelo, apresentaram altos teores de glucose (Tabela 16).

TABELA 16 - Composição monossacarídica das frações obtidas do líquen *Roccella decipiens*

Frações	Monossacarídeo (mol %) ⁽¹⁾		
	Manose	Galactose	Glucose
IW	8,2	6,3	85,5
IK	1,4	1,0	97,6
PFK	80,6	19,1	0,3
HPF	95,5	3,4	1,1
SmPF	100	-	-
ESF	46,2	53,3	0,5
RSF	43,1	55,7	1,2
HPRSF	97,6	2,1	0,3
SmRSF	100	-	-

(1) Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

Os espectros de RMN-¹³C destas frações (IW e IK; Figura 35) foram similares, apresentando seis sinais intensos que correspondem àqueles de laminaranas. Dados similares foram obtidos para o gênero *Cladina* (item 4.1).

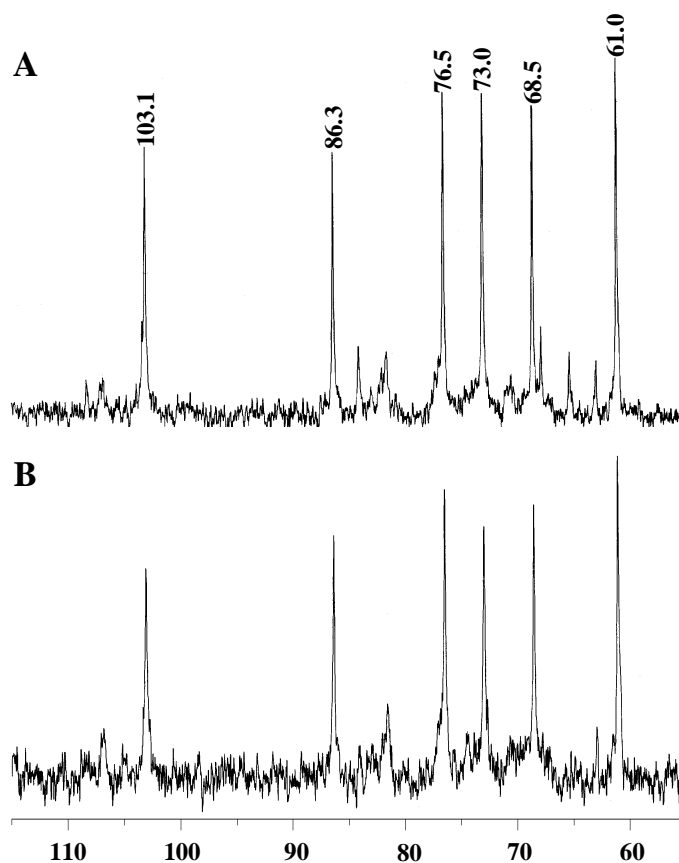


FIGURA 35 - Espectros de RMN- ^{13}C da fração IW (A) e IK (B) (laminaranas), em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a 70°C , obtida do líquen *Rocella decipiens*.

4.5.2 Caracterização Estrutural das Galactofuranomananas Presentes na Fração Solúvel em Água Fria

As frações solúveis em água fria (SW e SK), obtidas após processo por congelamento e degelo da extração alcalina (aquoso e alcalino) foram similares quanto à composição monossacarídica. Porém, devido ao maior rendimento apresentado pela fração SK, esta foi submetida aos processos de caracterização estrutural, descritos a seguir.

A fração SK foi tratada com solução de Fehling, originando um precipitado (PFK, 3,4 g%) e um sobrenadante (SFK, 2,0 g%).

A fração PFK mostrou ser composta por manose e galactose (Tabela 16) e forneceu um único pico (Figura 36A) quando analisado por HPSEC, apresentando M_w $20,5 \times 10^4$ (dn/dc 0,114). Enquanto que, a fração SFK apresentou perfil de eluição heterogêneo (Figura 36B), sendo purificada por ultrafiltração (membranas com limite de exclusão de 10 kDa), resultando em uma fração retida (RSF; Figura 36C) e outra dialisada (ESF; Figura 36D).

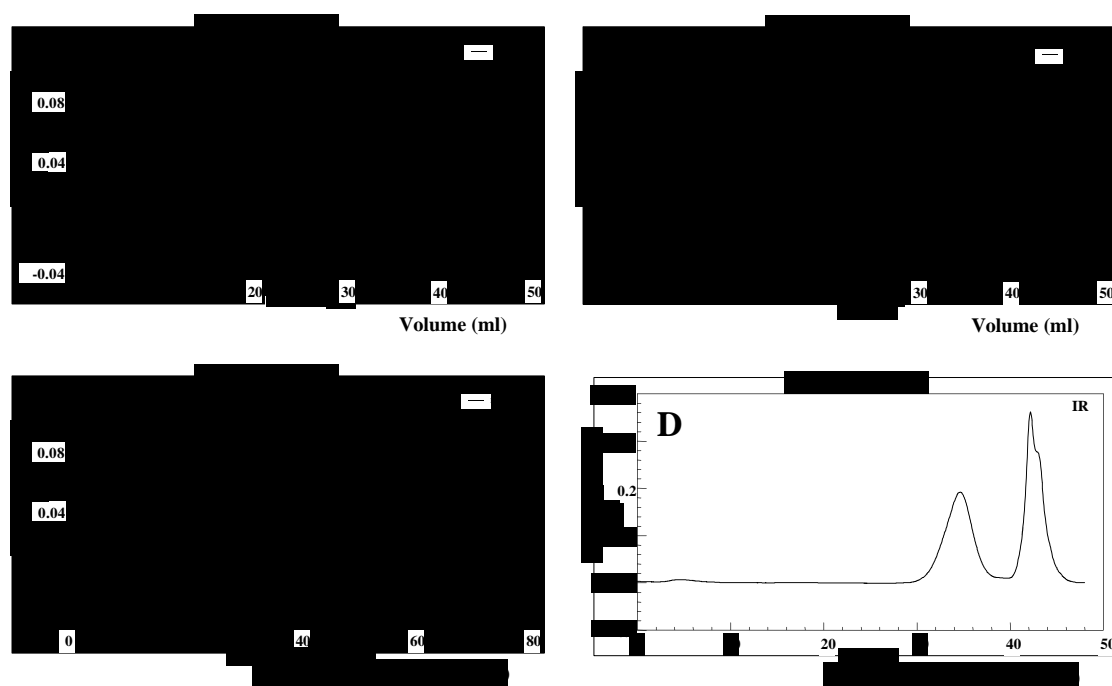


FIGURA 36 – Perfil de eluição das frações PFK (A), SFK (B) (solubilizadas em H₂O MilliQ), RSF (C) e ESF (D) (solubilizadas em nitrito de sódio 0,1 mol.l⁻¹, contendo azida sódica) obtidas do líquen *R. decipiens*, em HPSEC⁵.

As composições monossacarídicas (Tabela 16) e os espectros de RMN-¹³C das frações RSF e ESF (Figura 37A e 37B, respectivamente) foram similares, sugerindo que elas podem apresentar o mesmo polissacarídeo, mas com diferentes massas molares (ESF, M_w $27,8 \times 10^3$; RSF, M_w $46,4 \times 10^3$; dn/dc 0,132). De acordo com PEREYRA et al. (2003) as diferenças das massas molares são justificadas como um resultado das diferentes condições ambientais, as quais os talos líquênicos estão

⁵ Os picos observados após ~40 ml (A, B e D) 60 ml (C) são referentes aos solventes utilizados (nitrito de sódio 0,1 mol.l⁻¹, contendo azida sódica) ou H₂O MilliQ (inversão do pico).

expostos durante o seu período de vida, que promovem uma parcial degradação de seus componentes.

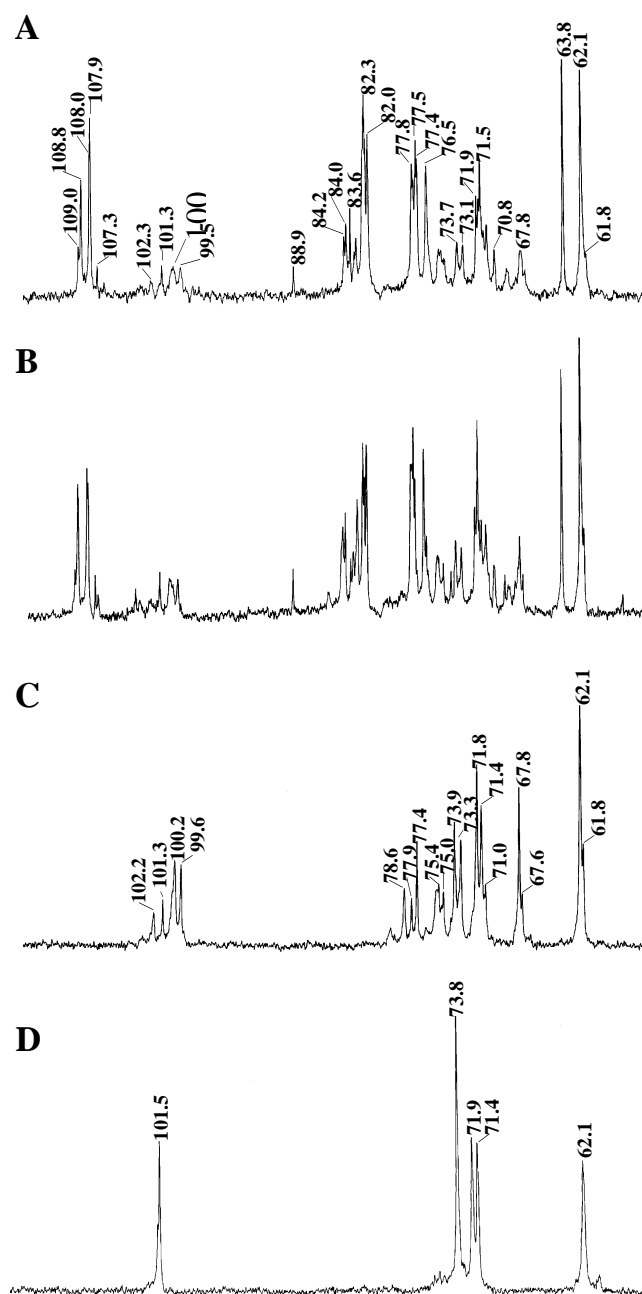


FIGURA 37 - Espectros de RMN-¹³C das frações RSF (A), ESF (B), HRSF (C) (amostras solubilizadas em D₂O, 30°C) e SmRSF (D) (em Me₂SO-*d*₆, 50°C).

Análise de metilação da fração PFK sugere a presença de uma estrutura altamente ramificada. Unidades de Gal β foram detectadas principalmente como terminais não redutores e, em menores proporções, como unidades 2-*O*-, 5-*O*-, 6-*O*- e 5,6-di-*O*- substituídas. Terminais não redutores de Man α , e unidades de Man α 2-*O*-, 4-*O*-, 6-*O*- e 2,4-di-*O*-substituídas também foram observadas (Tabela 17).

TABELA 17 - Análise por metilação das frações obtidas de *Rocella decipiens*

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados ⁽¹⁾	Frações (mol%)						Tipo de ligação ⁽²⁾
	PFK	HPF	SmPF	RSF	HRSF	SmRSF	
2,3,5,6-Me ₄ Gal	13,7	1,8	-	18,6	0,8	-	Gal β -(1→
3,5,6-Me ₃ Gal	0,5	-	-	0,3	-	-	→2)-Gal β -(1→
2,3,6-Me ₃ Gal	0,9	-	-	23,6	-	-	→5)-Gal β -(1→
2,3,5-Me ₃ Gal	0,7	-	-	7,8	-	-	→6)-Gal β -(1→
2,3-Me ₂ Gal	0,8	-	-	11,0	-	-	→5,6)-Gal β -(1→
2-MeGal	-	-	-	0,4	-	-	→3,5,6)-Gal β -(1→
2,3,4,6-Me ₄ Man	16,1	29,1	2,1	7,7	35,2	8,0	Man α -(1→
3,4,6-Me ₃ Man	11,0	11,2	-	5,3	15,5	-	→2)-Man α -(1→
2,3,6-Me ₃ Man	7,8	17,7	96,0	1,8	13,5	92,0	→4)-Man α -(1→
2,3,4-Me ₃ Man	12,2	2,7	-	5,5	2,8	-	→6)-Man α -(1→
4,6-Me ₂ Man	0,3	-	-	-	-	-	→2,3)-Man α -(1→
2,6-Me ₂ Man	-	-	-	0,2	-	-	→3,4)-Man α -(1→
3,6-Me ₂ Man	33,7	37,5	1,9	16,4	30,7	-	→2,4)-Man α -(1→
2,3-Me ₂ Man	0,3	-	-	0,2	-	-	→4,6)-Man α -(1→
3,4-Me ₂ Man	1,3	-	-	0,8	1,1	-	→2,6)-Man α -(1→
3-MeMan	0,7	-	-	0,4	0,4	-	→2,4,6)-Man α -(1→

(1) Analisado em GC-MS (DB 225) após metilação, metanólise, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) Baseado no derivados acetilados parcialmente *O*-metilados.

O espectro de RMN-¹³C da fração PF contém inúmeros sinais na região anomérica, consistente com uma estrutura complexa (Figura 38A).

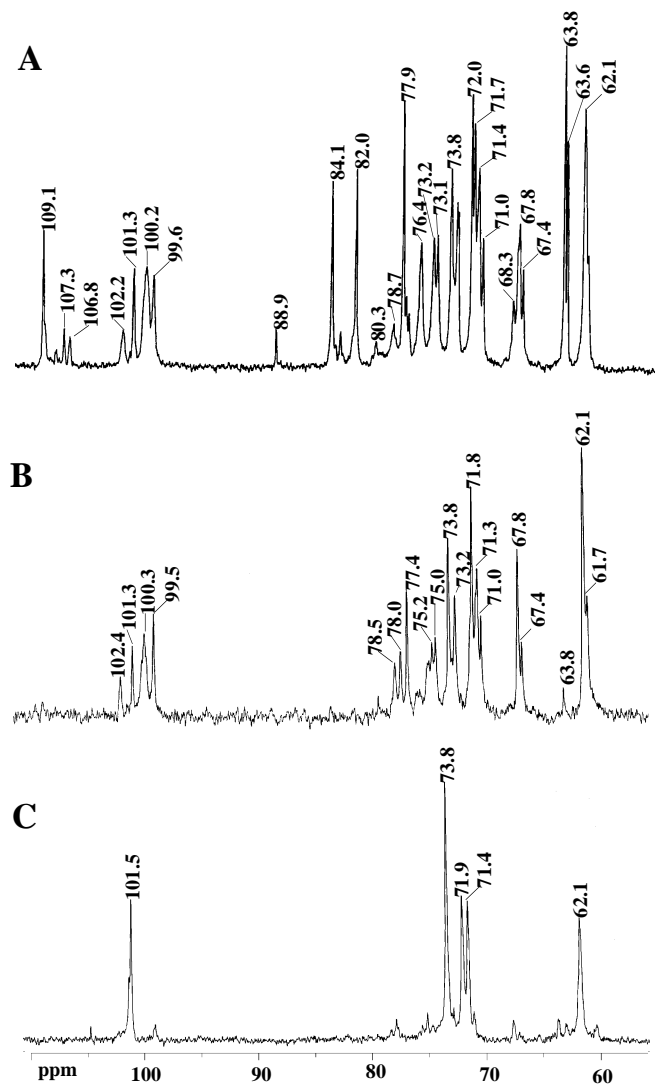


FIGURA 38- Espectros de RMN- ^{13}C das frações PFK (A) HPF (B) (em D_2O , 30°C) e SmPF (B) (em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, 50°C).

Os sinais de C-1 das unidades de β -Galf ($J_{\text{C-1,H-1}} = 175,5 \text{ Hz}$) em δ 109.1 refere-se as unidades terminais não redutores (PERLIN; CASU, 1969; GORIN; MAZUREK, 1975), e os sinais, de menores intensidades, em δ 108.0-106.8 correspondem as unidades substituídas em O-2, O-5, O-6 e O-5,6, estando de acordo com os dados obtidos pela análise de metilação (Tabela 17). Os sinais em δ 84.1, δ 82.0, δ 77.9 e 63.8 e 63.6 correspondem, respectivamente, ao C-4, C-2, C-3 e C-6 das unidades terminais não redutores de β -Galf (GORIN; MAZUREK, 1975).

Os sinais de C-1 em δ 99.6 a δ 102.2 são referentes aos carbonos anoméricos das unidades de Manp, sendo o sinal em δ 102.2 referente às unidades terminais não redutoras, e aqueles em δ 101.3, 100.3, 100.2 e 99.6 correspondem às unidades 2-*O*-, 6-*O*-, 4-*O*- e 2,4-di-*O*-substituídas (GORIN et al., 1977; GORIN et al., 1993). Estas unidades apresentaram uma configuração glicosídica do tipo α em decorrência do valor da constante de acoplamento de C-1/H-1 ($J_{C-1,H-1} = 172.7$ Hz) (PERLIN; CASU, 1969).

Os sinais de ^{13}C em δ 68.3, 63.8 e 62.1/61.8, correspondem, respectivamente, ao C-6 substituído das unidades de Manp-(1 \rightarrow 6) ligadas, C-6 não substituído das unidades de β -Galf, e grupos $-\text{CH}_2$ não substituído das unidades de Manp terminais não redutores, 2-*O*-, 4-*O*- e 2,4-di-*O*-substituídas. Estes assinalamentos foram confirmados pela inversão dos referidos sinais no experimento HSQC-DEPT.

Análise de metilação da fração RSF (Tabela 17), quando comparado com a fração PF, apresentou altos teores de unidades terminais não redutoras e 5-*O*-, 6-*O*- e 5,6-di-*O*-substituídas de Galf. Entretanto, os derivados parcialmente *O*-metilados de Manp foram os mesmos, porém em menores quantidades. O espectro de RMN- ^{13}C (Figura 39A) apresentou, na região anomérica, intensos sinais de β -Galf em δ 109.0 e 108.8 [β -Galf-(1 \rightarrow)], δ 108.0 [\rightarrow 5,6)- β -Galf-(1 \rightarrow)], δ 107.9 [\rightarrow 5)- β -Galf-(1 \rightarrow)] e δ 107.3 [\rightarrow 6)- β -Galf-(1 \rightarrow)] (LEAL et al., 1993; NAGAOKA et al., 1996). Os sinais de menor intensidade em δ 102.3, δ 101.3, δ 100.2 e δ 99.5 são referentes a unidades de Manp.

Com a finalidade de remover as unidades de Galf destas frações (PF e RSF), as mesmas foram submetidas à hidrólise ácida parcial. Os produtos resistentes obtidos foram denominados de HPF e HRSF, respectivamente. Como pode ser observado (Tabela 17, Figura 37B e 38B), este procedimento eliminou seletivamente estas unidades, restando apenas o “core” deste polímero, o qual é composto, principalmente, por manose (Tabela 16).

Análise de metilação das frações HPF e HRSF (Tabela 17) mostrou apenas o derivado 2,3,5,6-Me₄Gal em pequenas quantidades, indicando que a hidrólise ácida

parcial foi eficiente na remoção das unidades de *Gal*f. Tanto a fração HPF quanto a HRSF, apresentaram similares teores de unidades de *Man*p terminais não redutoras, 2-*O*-, 4-*O*- e 2,4-di-*O*-substituídas. O aumento da proporção das unidades terminais não redutoras de *Man*p e o decréscimo das unidades de *Man*p 6-*O*-substituídas obtidos após hidrólise parcial sugerem que as unidades de *Gal*f, as quais foram removidas, estão ligadas àquelas *Man*p (provavelmente, ligadas em O-6) das cadeias laterais, e não da cadeia principal. Estes dados foram observados para as duas frações.

Os sinais observados na região anomérica do espectro de RMN-¹³C das frações HRSF e HPF (Figura 37B e 38B, respectivamente) estão de acordo com os dados de metilação, apresentando apenas os sinais de C-1 em δ 99.5-102.4 referentes às unidades de *Man*p.

A estrutura da cadeia principal destas frações foi determinada através de uma degradação controlada de Smith, resultando nas frações SmPF e SmRSF, que são compostas somente por manose (Tabela 16). Análise de metilação indicou a presença de uma manana linear contendo ligações do tipo (1→4) (Tabela 17), estando de acordo com seu espectro de RMN-¹³C (Figura 37C e 38C), com sinais em δ 101.5 (C-1), δ 73.8 (C-4 e C5), δ 71.9 (C-3), δ 71.4 (C-2) e δ 62.1 (C-6) (GORIN; MAZUREK, 1975).

De acordo com os dados obtidos, a fração PF consiste em uma galactomanana altamente ramificada com uma cadeia principal composta por unidades de α -*Man*p (1→4) ligadas, parcialmente substituída em O-2 por cadeias laterais de unidades de α -*Man*p (1→2) e (1→6)-ligadas. As unidades de *Gal*f estão ligadas nas extremidades das unidades (provavelmente em O-6) de *Man*p das cadeias laterais.

A estrutura da RSF é basicamente a mesma, mas com uma maior proporção de unidades de *Gal*f, principalmente, como 5-*O*-, 6-*O*- e 5,6-di-*O*-substituídas.

Até a presente data, não foi observado similaridade com outros heteropolissacarídeos previamente isolados de líquens, os quais usualmente apresentam cadeia principal de unidades de α -manopirranose contendo ligações do tipo (1→6), substituídas principalmente em O-2, O-4 ou O-2,4 por unidades de α - ou β -*Gal*p, α -*Man*p ou *Glc*p e, mais raramente, por β -*Gal*f (GORIN; BARON; IACOMINI,

1988; GORIN et al., 1993; OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001; GORIN; IACOMINI, 1985),

Heteropolissacarídeos contendo manose têm sido isolado de algumas espécies de líquens, principalmente das famílias Cladoniaceae, Parmeliaceae, Umbilicariaceae, Ramalinaceae e Stereocaulaceae (GORIN et al., 1993; OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001; CORDEIRO et al., 2003), os quais estão associados com uma alga trebouxioide como fotobionte primário (TSCHERMAK-WOESS, 1988; FRIEDL; BÜDEL, 1996). De outro lado, *R. decipiens*, contém galactomananas com estruturas novas, e está liquenizado com um fotobionte do gênero *Trentepohlia* (uma alga verde filamentosa).

4.6 β -Glucana (1 \rightarrow 6)-ligada, β -glucana (1 \rightarrow 3)-ligada e galactofuranomanana de *Umbilicaria mammulata*

O fungo liquenizado *Umbilicaria mammullata* (100 g) foi submetido, sucessivamente, à extrações aquosas e alcalinas (KOH 2%), como descrito na Figura 39. Além destas, foi realizada uma extração com Me₂SO (temperatura ambiente por 48 h) utilizando apenas uma alíquota (7 g) do líquen moído. Este procedimento foi realizado, uma vez que, sabe-se que este gênero pode apresentar moléculas parcialmente *O*-acetiladas e que extrações aquosas a quente e alcalinas podem promover a migração ou remoção destes grupos, respectivamente (REICHER; CORRÊA; GORIN, 1984).

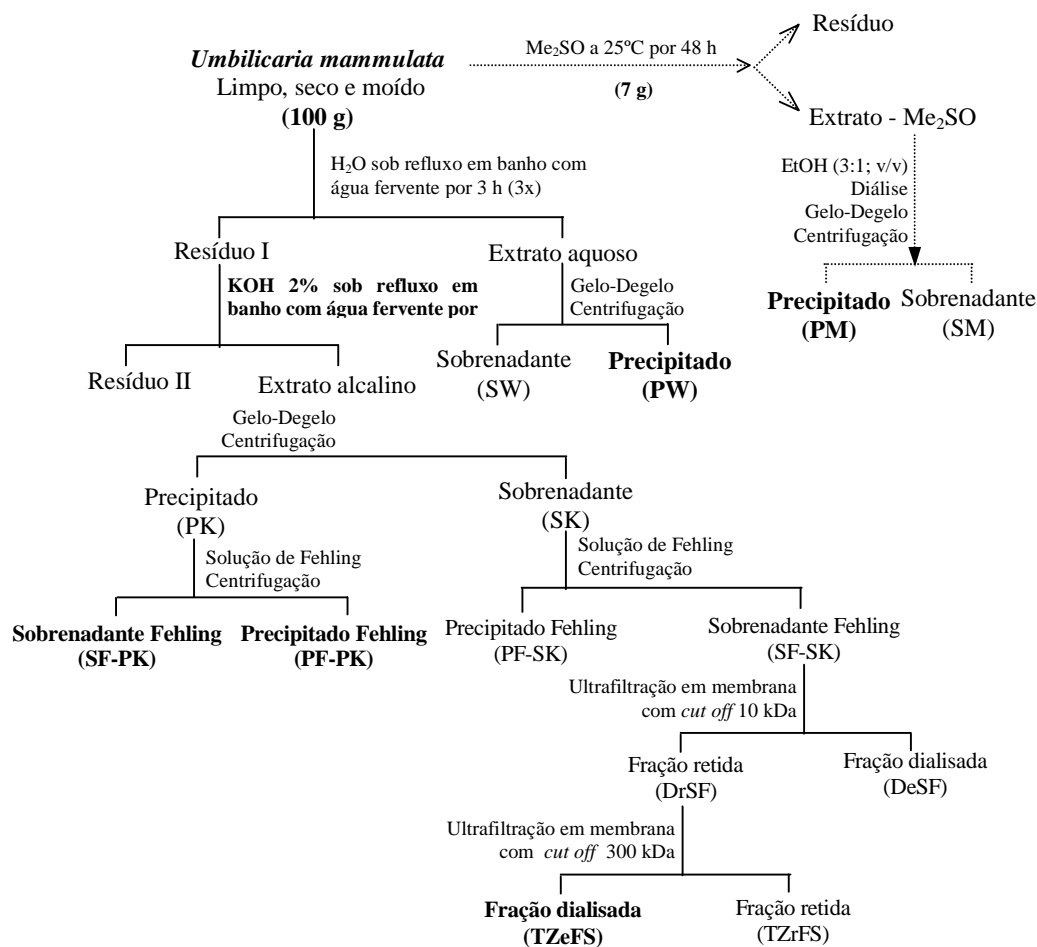


FIGURA 39 - Fluxograma de extração e purificação dos polissacarídeos do líquen *Umbilicaria mammulata*

Os polissacarídeos obtidos, por extrações aquosas e com Me₂SO seguido por precipitação com etanol, contém os mesmos polímeros sendo compostos,

principalmente, por glucose (~97%). Após processo de congelamento e degelo, as frações insolúveis obtidas (PW e PM, para as extrações aquosas e Me₂SO, respectivamente) apresentaram alto rendimento (19,6 g%) correspondendo a uma β-glucana (1→6) parcialmente *O*-acetilada. O espectro de RMN-¹³C (Figura 40) da fração PM apresentou seis sinais principais correspondentes àqueles da β-glucana (1→6): δ 103.1 (C-1), 76.4 (C-3), 75.4 (C-5), 73.3 (C-2), 69.9 (C-4) e 68.4 (C-6). Sinais em δ 77.7 e 71.2 correspondem aos carbonos substituídos por grupos acetil, e os sinais em δ 20.8 e 175.0 correspondem ao -CH₃ e -C=O destes grupos, respectivamente (BARON, 1989).

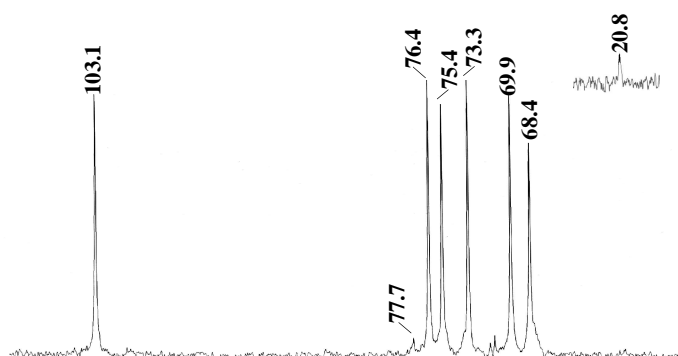


FIGURA 40 - Espectro de RMN-¹³C da fração PM (pustulana parcialmente *O*-acetilada), em Me₂SO-*d*₆ (70°C), obtida do líquen *Umbilicaria mammulata*..

O extrato alcalino também foi submetido ao processo de purificação por congelamento e degelo. O precipitado obtido (PK, 7,9 g%) foi submetido à precipitação com solução de Fehling, resultando em um sobrenadante (SF-PK, 0,5 g%) e um precipitado (PF-PK, 7,1 g%). Tanto a fração solúvel quanto a insolúvel correspondem a glucanas. A fração PF-PK apresentou a mesma pustulana a qual foi isolada a partir de extrações aquosas e com Me₂SO, exceto pela ausência dos grupos *O*-acetil os quais foram removidos pelo tratamento alcalino. A fração SF-PK apresentou um espectro de RMN-¹³C (Figura 41) idêntico àqueles, referentes a β-glucana (1→3)-ligada (laminarana), obtidos para os líquens *Cladina* spp., *Leptogium*

spp. e *Rocella decipiens*. Os sinais observados no espectro de RMN- ^{13}C foram: δ 102.8 (C-1), 86.0 (C-3), 76.2 (C-5), 72.7 (C-2), 68.3 (C-4) e 60.7 (C-6) (CARBONERO et al., 2001).

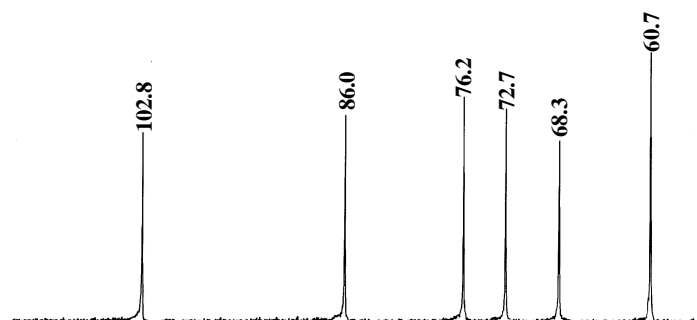


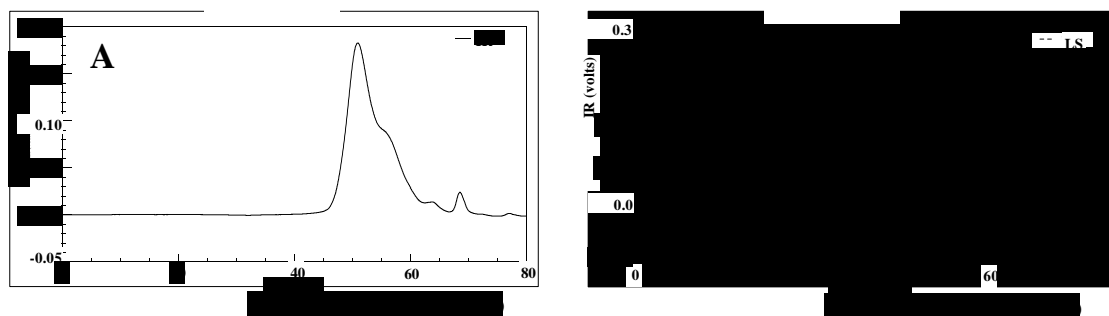
FIGURA 41 - Espectro de RMN- ^{13}C da fração SF-SK (laminarana), em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ (50°C), obtida do líquen *Umbilicaria mammulata*.

Glucanas são polissacarídeos amplamente conhecidos e foram encontradas em todas as espécies de líquens estudados. As β -glucana (1 \rightarrow 6)-ligada (pustulana) parcialmente *O*-acetiladas são polissacarídeos típicos de Umbilicariaceae, sendo descrita para diversas espécies de líquens do gênero *Umbilicaria*, como *U. pustulata*, *U. hirsuta* (DRAKE, 1943), *U. angulata*, *U. caroliniana* e *U. polyphylla* (NISHIKAWA et al., 1970), bem como *Lasallia pustulata* (PEREYRA et al., 2003) e *Actinogyra muehlenbergii* (BARON, 1989). Glucanas do tipo laminarana são comumente encontradas em líquens pertencentes a diferentes famílias (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001), fungos de vida livre (BARRETO-BERGTER; GORIN, 1983) e algas (PAINTER, 1983).

A fração solúvel (SK) em água fria também foi analisada. Esta foi submetida à precipitação com o reativo de Fehling, apresentando uma fração sobrenadante (SF-SK, 4,6 g%) e uma precipitado (PF-SK, 0,8 g%). A principal fração foi a SF-SK a qual apresentou-se heterogênea (Figura 42A), sendo purificada por ultrafiltração em membranas com limite de exclusão 10 e 300 kDa, respectivamente (Figura 39). A fração TZeSF (3,1 g%) mostrou um perfil de eluição homogêneo quando analisado por HPSEC-MALLS (Figura 42B), apresentando uma M_w 48×10^3 ($dn/dc = 0,133$) e

manose (65,2%), galactose (33,3%) e glucose (1,5%) como componentes monossacarídicos.

FIGURA 42 – Perfil de eluição das frações SF-SK (A) e TZeSF (B) (solubilizadas em nitrito de sódio



0,1 mol.l⁻¹, contendo azida sódica) obtidas do líquen *Umbilicaria mammulata*, em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS).

Baseado nos derivados parcialmente *O*-metilados obtidos por análise de metilação (Tabela 18), esta fração consiste em uma estrutura altamente ramificada, sendo observado altos teores de unidades terminais não redutoras de Manp (14,5%) e Galf (23,8%). Todas as unidades de galactose foram encontradas na forma furanosídica, sendo em sua maioria terminais não redutores (23,8%) e unidades 2-*O*- (2,3%) e 5-*O*- (1,4%) substituídas. A cadeia principal é constituída por unidades de α -Manp (1→6) ligadas, as quais são não substituídas (4,1%) ou 3-*O*- (4,0%), 4-*O*- (8,3%), 2-*O*- (11,8%), 2,4-di-*O*- (14,1%) e 2,3-di-*O*-substituídas (3,5%).

O espectro de RMN-¹³C deste heteropolissacarídeo (Figura 43A) apresentou inúmeros sinais na região anomérica, reforçando os dados de metilação. Os sinais de C-1 em campo baixo em δ 108.8 a 105.2 referem-se a unidades de β -Galf, sendo o sinal intenso em δ 108.8 referentes às unidades terminais não redutoras de Galf, enquanto que os outros correspondem às unidades de Galf substituídas (LEAL et al., 1993; NAGAOKA et al., 1996). Também foram observados sinais na região anomérica de unidades de α -Manp, os quais correspondendo a unidades terminais não redutoras (δ 103.3) e 2-*O*-substituídas das cadeias laterais (δ 101.6). Além de unidades

de α -Manp (1→6) ligadas da cadeia principal não substituídas (δ 100.1), ou di- ou tri-
O-substituídas (δ 99.2) (GORIN et al., 1993).

TABELA 18 - Análise por metilação das frações TzeSF e HP10 obtidas de *Umbilicaria mammulata*

Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados ⁽¹⁾	mol%		Tipo de ligação ⁽²⁾
	TZeSF	HP10	
2,3,4,6-Me ₄ Man	14,5	15,5	Manp-(1→
2,3,4,6-Me ₄ Glc	-	0,2	Glc p-(1→
2,3,5,6-Me ₄ Gal	23,8	2,8	Gal f-(1→
3,4,6-Me ₃ Man	6,4	38,5	→2)-Manp-(1→
3,5,6-Me ₃ Gal	2,3	-	→2)-Gal f-(1→
2,3,6-Me ₃ Man	0,4	1,6	→4)-Manp-(1→
2,3,6-Me ₃ Gal	1,4	-	→5)-Gal f-(1→
2,3,4-Me ₃ Man	4,1	22,6	→6)-Manp-(1→
2,3,6-Me ₃ Glc	-	0,7	→4)-Glc p-(1→
2,3,5-Me ₃ Gal	1,6	-	→6)-Gal f-(1→
4,6-Me ₂ Man	4,0	0,6	→2,3)-Manp-(1→
3,6-Me ₂ Man	0,2	0,4	→2,4)-Manp-(1→
2,3-Me ₂ Man	8,3	0,7	→4,6)-Manp-(1→
3,4-Me ₂ Man	11,8	14,1	→2,6)-Manp-(1→
2,4-Me ₂ Man	0,6	0,5	→3,6)-Manp-(1→
2,3-Me ₂ Gal	0,7	-	→5,6)-Gal f-(1→
2-MeMan	1,0	-	→3,4,6)-Manp-(1→
2-MeGal	0,3	-	→3,5,6)-Gal f-(1→
3-MeMan	14,1	0,6	→2,4,6)-Manp-(1→
4-MeMan	3,5	0,4	→2,3,6)-Manp-(1→

(1) Analisado em GC-MS (DB 225) após metilação, metanólise, hidrólise ácida total, redução (NaB²H₄) e acetilação.

(2) Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilados.

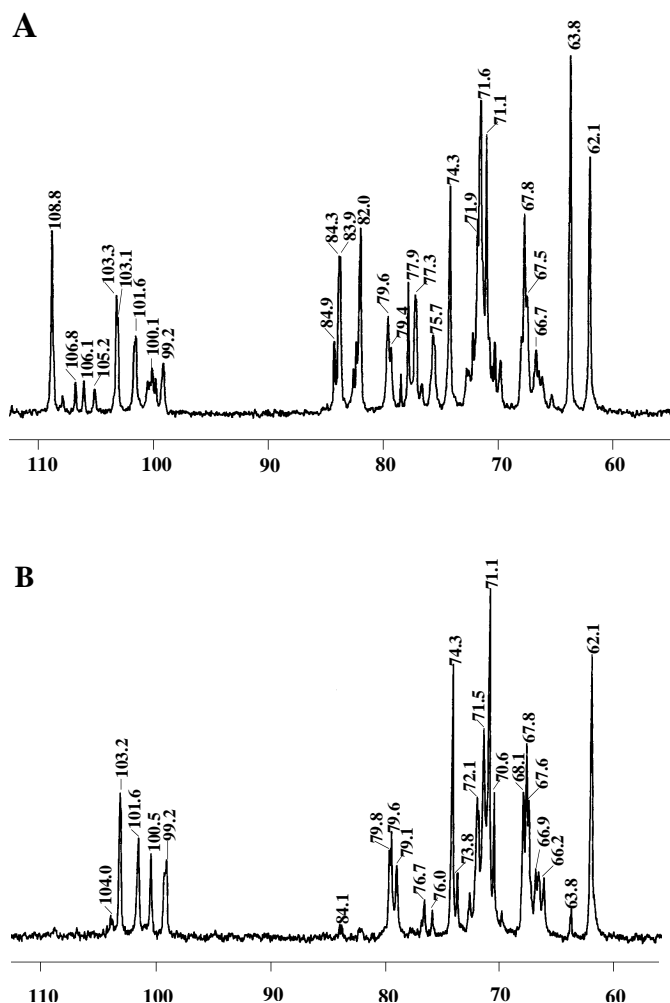


FIGURA 43 - Espectros de RMN- ^{13}C das frações TZesF (A) e HP10 (B), em D_2O (30°C), obtidas do líquen *Umbilicaria mammulata*.

Com o objetivo de elucidar este complexo polímero, esta fração foi submetida a uma hidrólise ácida parcial (TFA pH 2,0 sob refluxo em banho com H_2O fervente por 10 h). A fração resistente a este procedimento (HP10) apresentou manose (93,6%), galactose (3,2%) e glucose (3,2%), quando analisado por GC-MS. O espectro de RMN- ^{13}C de HP10 (Figura 43B) mostrou uma eliminação dos sinais referentes as unidades de Galf, e uma melhor definição dos sinais de $\alpha\text{-Manp}$.

Os sinais de ^{13}C em δ 66.9 a 62.1 aos grupos $-\underline{\text{C}}\text{H}_2$. Os sinais em δ 66.2, 67.7 e 66.9 referem-se aos C-6's substituídos das unidades de $\alpha\text{-Manp}$ da cadeia principal e o sinal em δ 62.1 corresponde ao C-6 dos terminais não redutores e das unidades de

Manp 2-*O*-substituídas. Estes assinalamentos foram confirmados pela inversão dos mesmos na análise de RMN-¹³C-DEPT.

Os resultados de metilação obtidos concordaram com as análises espectroscópicas, sendo possível observar um decréscimo significativo do derivado 2,3,5,6-Me₄Gal. O teor do derivado parcialmente *O*-metilado 2,3,4,6-Me₄Man foi mantido após hidrólise ácida parcial, sugerindo que as unidades de Galf não estão ligadas às unidades de Manp das cadeias laterais, e sim da cadeia principal. Em adição, um aumento de 2,3,4-Me₃Man junto com um decréscimo de 2,3-Me₃Man reforça a idéia de que as unidades de galactose podem estar substituindo as unidades de Manp em O-4.

A partir deste estudo foi possível isolar e caracterizar duas glucanas típicas encontradas em líquens. A pustulana foi encontrada em maior proporção, quando comparada aos outros polissacarídeos isolados, uma vez que esta é um polímero típico de Umbilicariaceae. Também foi obtido uma galactofuranomanana a partir do extrato alcalino, sendo similar àquelas encontradas nas espécies pertencentes à família Umbilicariaceae, como *U. pustulata*, *U. spodochoa* (KJØLBERG; KVERNHEIM, 1989), *Lasallia pustulata* (PEREYRA et.al., 2003).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das 15 espécies de fungos liquenizados estudados foram isolados e caracterizados vários polissacarídeos, como glucanas, xilanas, mananas, galactomananas, galactofuranomananas, galactoglucomananas, galactomanoglucanas e um heteropolissacarídeo ácido. Para um melhor entendimento os resultados obtidos encontram-se agrupados na Tabela 19.

TABELA 19 – Polissacarídeos obtidos nas espécies de fungos liquenizados estudados

Família Gênero/espécie	Fotobionte	Homopolímeros	Heteropolissacarídeos
Cladoniaceae			
<i>Cladina arbuscula</i>	<i>Asterochloris</i>	Laminarana Nigerana (1:1)	57:43:03 ^(1,2) / 41: 47:12 ^(1,3)
<i>C. confusa</i>		Laminarana Nigerana (1:1)	63:32:05 ^(1,2) / 40: 49:11 ^(1,3)
<i>C. substenius</i>		Laminarana Nigerana (1:1)	55:41:04 ^(1,2) / 47: 40:13 ^(1,3)
Collemataceae			
<i>Leptogium azureum</i>	<i>Nostoc</i>	Laminarana	83:17:00 ^(1,4) Heteropolissacarídeo ácido ⁽⁵⁾
<i>Leptogium</i> sp.		Laminarana	Heteropolissacarídeo ácido ⁽⁵⁾
Dictyonemataceae			
<i>D. glabratum</i>	<i>Scytonema</i>	Pseudonigerana β-D-xilana (1→4) β-D-manana (1→6)	
Parmeliaceae			
<i>Parmotrema austrosinense</i>	<i>Trebouxia</i>	Nigerana (1:1) Liquenana (1: 3.1)	51:44:05 ^(1,2)
<i>P. delicatulum</i>		Nigerana (1:1) Liquenana (1: 3.1)	49:44:06 ^(1,2)
<i>P. mantiqueirense</i>		Nigerana (1:1) Liquenana (1: 3.1)	51:43:06 ^(1,2)
<i>P. schinderii</i>		Nigerana (1:1) Liquenana (1: 3.1)	50:43:07 ^(1,2)
<i>P. tinctorum</i>		Nigerana (1:1) Liquenana (1: 3.1)	52:42:06 ^(1,2)
<i>Rimelia cetrata</i>		Nigerana (1:1) Liquenana (1: 3.1)	53:40:07 ^(1,2)
<i>R. reticulata</i>		Nigerana (1:1) Liquenana (1: 3.1)	52:40:08 ^(1,2)
Roccellaceae			
<i>Roccella decipiens</i>	<i>Trentepohlia</i>	Laminarana	81:19:00 ^(1,6) / 43:56:01 ^(1,6)
Umbilicariaceae			
<i>Umbilicaria mammulata</i>	<i>Trebouxia</i>	Laminarana Pustulana	65:33:02 ^(1,7)

(1) Proporção molar de Man:Gal:Glc;

(2) Galactoglucomanana [Cadeia principal formada por unidades de α -D-Manp (1 \rightarrow 6)];

(3) Galactomanoglucana [Cadeia principal formada por unidades de β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)];

(4) Galactomanana altamente substituída [Cadeia principal formada por unidades de α -D-Manp (1 \rightarrow 6)];

(5) Heteropolissacarídeo composto por Xyl:Man:Gal: 3-O-MeGalp:Glc e um composto ácido não identificado;

(6) Galactofuranomanana [Cadeia principal formada por unidades de α -D-Manp (1 \rightarrow 4)];

(7) Galactofuranomanana [Cadeia principal formada por unidades de α -D-Manp (1 \rightarrow 6)];

Analisando o gênero *Cladina*, o qual foi segregado de *Cladonia*, apresentou nigeranas, laminaranas, galactomananoglucanas e galactoglucomananas, sendo similares àqueles obtidos para as diversas espécies do gênero *Cladonia* (WORANOVICZ et al., 1997; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a,b,c,d). Estes resultados, juntamente com os dados obtidos pelas análises de DNA (AHTI; DEPRIEST, 2001), sugerem que estes gêneros deverão ser reagrupados.

Os gêneros *Parmotrema* e *Rimelia*, os quais foram segregados anteriormente, apresentaram liquenanas, nigeranas e galactoglucomananas. Para as espécies estudadas, as glucanas apresentaram-se idênticas, enquanto que as galactoglucomananas apresentaram-se similares com diferenças típicas entre espécies. Portanto, a caracterização química dos polissacarídeos dos gêneros *Parmotrema* e *Rimelia*, associada aos dados das análises de DNA (CRESPO; CUBERO, 1998), sugerem uma reconsideração da segregação do gênero *Rimelia*. Somente para *P. mantiqueirense* foi realizada uma extração com KOH 10% a quente, obtendo-se uma β -glucana (1 \rightarrow 6) linear, denominada de pustulana, o que poderá ser investigado nas outras espécies.

Com relação ao fungo liquenizado *Roccella decipiens*, o qual está associado a alga do gênero *Trentepohlia*, foi obtido uma laminarana e duas galactofuranomananas. Até a presente data, não foi observado similaridade com outros heteropolissacarídeos previamente isolados de líquens.

O gênero *Leptogium* (fotobionte do gênero *Nostoc*) contém laminaranas e um polissacarídeo não usual, contendo grupamentos ácidos e o derivado 3-*O*-Me-Galp, não observados anteriormente em líquens. Foi caracterizado a partir de *Leptogium azureum* uma galactomanana altamente substituída em O-2 por terminais não redutores de α -D-Manp e/ou β -D-Galp. As unidades de β -D-Galp substituem as unidades de α -D-Manp da cadeia principal em O-2 e não em O-4, como geralmente observado.

No basidiolíquen *D. glabratum*, o qual encontra-se associado a alga *Scytonema* sp., foi observado uma β -D-xilana linear ligada (1 \rightarrow 4), uma

pseudonigerana e uma β -D-manana contendo ligações do tipo (1→6), sendo os últimos não observados anteriormente nestes organismos.

O gênero *Leptogium* (fotobionte do gênero *Nostoc*) contém laminaranas e um polissacarídeo não usual, contendo grupamentos ácidos e o derivado 3-*O*-Me-Galp, não observados anteriormente em líquens. Foi caracterizado a partir de *Leptogium azureum* uma galactomanana altamente substituída em O-2 por terminais não redutores de α -D-Manp e/ou β -D-Galp. As unidades de β -D-Galp substituem as unidades de α -D-Manp da cadeia principal em O-2 e não em O-4, como geralmente observado.

No basidiolíquen *D. glabratum*, o qual encontra-se associado a alga *Scytonema* sp., foi observado uma β -D-xilana linear ligada (1→4), uma pseudonigerana e uma β -D-manana contendo ligações do tipo (1→6), sendo os últimos não observados anteriormente nestes organismos.

Polissacarídeos típicos da família Umbilicariaceae foram caracterizados no líquen *Umbilicaria mammulata* (*Trebouxia* sp.), sendo estes uma laminarana, uma pustulana (parcialmente *O*-acetilada) e uma galactofuranomanana.

Avaliando os resultados obtidos, verifica-se um padrão característico de distribuição dos polissacarídeos dentro de família e/ou gêneros. Desta forma, os dados reforçam a utilização de polissacarídeos como uma ferramenta adicional para a quimiotaxonomia.

Neste trabalho foram observadas diferenças estruturais significativas em polissacarídeos de fungos liquenizados associados a fotobiontes pouco explorados do ponto de vista científico (*Scytonema*, *Trentepohlia* e *Nostoc*), quando comparadas àquelas mais comuns (*Trebouxia* e *Asterochloris*). A influência do fotobionte sobre os polissacarídeos presentes nos talos liquênicos ainda não é conhecida. Portanto, estudos adicionais com fungos liquenizados contendo fotobiontes não usuais deverão ser realizados com a finalidade de um melhor entendimento da associação micobionte-fotobionte na determinação estrutural dos polissacarídeos.

REFERÊNCIAS

ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J. K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 74, p. 4970-4971, 1952.

ADAM, W. W.; DEMMING-ADAMS, B.; LANGE, O. L. Carotenoid composition and metabolism in green and blue-green algal lichens in the field. **Oecologia**, v. 94, n. 4, p. 576-584, 1993.

AGHORAMURTH, K.; SARMA, K. G.; SESHADRI, T. R. Chemical investigation of Indian lichens. **J. Sci. Ind. Res.**, v. 20, p. 166-168, 1961.

AHMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1993.

AHTI, T.; DEPRIEST, P. T. New combination of *Cladina* epithets in *Cladonia* (Ascomycotina, Cladoniaceae). **Mycotaxon**, v. 78, p. 499-502, 2001.

ASPINALL, G.O. General Introduction. In: ASPINALL, G. O. (Ed.). **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1982. v. 1. p. 1-18.

BARINAGA, M. Origins of lichen fungi explored. **Science**, v. 268, p. 1437, 1995.

BARRETO-BERGTER, E; GORIN, P. A. J. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 41, p. 67-103, 1983

BARON, M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Isolation and identification of a linear (1→3)-linked β -D-glucan and other carbohydrate components of the lichen *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) Räscher. **Carbohydr. Res.**, v. 177, p. 235-239, 1988.

BARON, M.; IACOMINI, M.; FANTA, E. S.; GORIN, P. A. J. Galactomannan, lichenan and isolichenan from the polysaccharide-rich lichen *Newropogon aurantiaco-ater*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 9, p. 3125-3126, 1991.

BARON, M. **Estudo comparativo entre polissacarídeos isolados dos líquens *Stereocaulon ramulosum* (Sw.) Räscher, *Newropogon aurantiaco-ater* e *Actinogyra muehlenbergii***. Curitiba, 1989. 199 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BÜDEL, B. Taxonomy of lichenized procaryotic blue-green algae. In: REISSER, W. (Ed.) *Algae and symbiosis*. Bristol: Biopress, 1992. p. 301-324.

CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; STUELP, P.; GORIN, P. A. J.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 194, p. 65-69, 2001.

CARPITA, N. C.; SHEA, E. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. (Ed.). **Analysis of carbohydrates by GLC and MS**. Boca Raton: CRC Press, 1987. p. 157-216.

CHANDA, N.B.; HIRST, E.L.; MANNERS, D. J. A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland moss (*Cetraria islandica*). **J. Chem. Soc.**, London, p.1951-1958, 1957.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v.131, p. 209-217, 1984.

COMMON, R. S. The distribution and taxonomic significance of lichenan and isolichenan in the Parmeliaceae (Lichenized Ascomycotina), as determined by iodine reactions. I. Introduction and methods. II. The genus *Alectoria* and associated taxa. **Mycotaxon**, v. 41, p. 67-112, 1991.

CORDEIRO, L. M. C.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides from species of the genus *Ramalina*-lichenized fungi-of three distinct habitats. **Phytochemistry**, v. 63, p. 967-975, 2003a.

CORDEIRO, L. M. C.; REIS, R. A.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; FERREIRA, J. C.; IACOMINI, M. Linear β -mannose-containing polysaccharide, β -xylan, and amylose from the cultured photobiont *Trebouxia* sp. of the ascolichen *Ramalina celastri*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 220, p. 89-94, 2003b.

CORDEIRO, L. M. C.; MONTAI, A. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Investigation on the polysaccharide production by the chlorolichen *Pseudocyphellaria clathrata* (de Not.) Malme. **The Bryologist**, 2004 (*in press*).

CORRADI da SILVA, M. L.; IACOMINI, M.; JABLONSKI, E.; GORIN, P. A. J. Carbohydrate, glycopeptide and protein components of the lichen *Sticta* sp. and effect of storage. **Phytochemistry**, v. 33, p. 547-552, 1993.

CORRADI da SILVA, M. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Unusual carbohydrates from the lichen, *Parmotrema cetratum*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, 715-717, 1993.

CRESPO, A.; CUBERO, O. F. A molecular approach to the circumscription and evaluation of some genera segregated from *Parmelia* s. lat. **The Lichenologist**, v. 30, p. 369-368, 1998.

CZEZUGA, B.; XAVIER FILHO, L. Investigations on carotenoids in lichens. VII. Some lichens from Brazil. **Rev. Bras. Biol.**, v. 47, p. 243-246, 1987.

CZEZUGA, B.; SKULT, H. Carotenoids in lichens of Southern Finland. **Ann. Bot. Fennici**, v. 25, p. 229-232, 1988.

DRAKE, B. Some polyglucides of lichens, particularly lichenin and newly discovered pustulin. **Biochem.**, v. 313, p. 338-399, 1943.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DYER, J. R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. **Methods Biochem. Anal.**, v. 3, p. 112-149, 1956.

ELIX, J. A. Parmeliaceae. **Flora of Australia**, v. 55, p. 140-186, 1994.

ELIX, J. A. Biochemistry and secondary metabolites. In: NASH III, T. H.(Ed.). **Lichen Biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

FILISETTI-COZZI, T. M. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FRIEDL, T.; BÜDEL, B. Photobionts. In: NASH III, T. H. (Ed). **Lichen biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996; p. 113-119.

GORIN, P. A. J. Rationalization of carbon-13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. **Can. J. Chem.**, v. 51, p. 2375-2383, 1973.

GARGAS, A.; DePRIEST, P. T.; GRUBE, M.; TEHLER, A. Multiple origins of lichen symbiosis in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. **Science**, v. 268, p. 1492-1495, 1995.

GALUN, M. Lichenization. In: GALUN, M. (Ed.). **CRC Handbook of Lichenology**. Boca Raton: CRC Press, 1998. v. 2. p. 153-159.

GOLA, G.; NEGRI, G.; CAPPELLETI, C. **Tratado de Botânica**. Barcelona, 2. ed., p. 793-805, 1965.

GORIN, P. A. J.; HORITSU, K.; SPENCER, J. F. T. An exocellular mannan alternately linked 1,3- β and 1,4- β from *Rhodotorula glutinis*. **Can. J. Chem.**, v. 43, p. 950-954, 1965.

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T.; BHATTACHARJEE, S. S. Structures of yeast mannans containing both α and β -linked mannopyranose units. **Can. J. Chem.**, v. 47, p. 1499-1505, 1969.

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T. Proton magnetic resonance spectroscopy: an aid in identification and classification of yeasts. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 13, p. 25-89, 1970.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, v. 53, n. 8, p. 1212-1223, 1975.

GORIN, P. A. J.; HASKINS, R. H.; TRAVASSOS, L. R.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Further studies on the rhamnomannans of *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis stenoceras*. **Carbohydr. Res.**, v. 55, 21-33, 1977.

GORIN, P. A. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 38, p. 13-104, 1981.

GORIN, P. A. J.; BARRETO-BERGTER, E. The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In: ASPINALL, G.O. (Ed.). **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983. v. 2. p. 365-409.

GORIN, P. A. J.; BARON, M, da SILVA, M. L. C.; TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M. Lichen carbohydrates. **Ciência e Cultura**, v. 45, p. 27-36, 1993.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, v.128, p. 119-132, 1984.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. **Carbohydr. Res.**, v. 142, p. 253-267, 1985.

GORIN, P. A. J.; BARON, M.; IACOMINI, M. Storage products of lichens. In: GALUN, M. (Ed.). Boca Raton: CRC Press CRC Handbook of Lichenology, 1988. v. III, p. 9-23.

GORSHKOVA, R. P.; NAZARENKO, E.L.; ZUBKOV, V. A.; STEPANENKO, L.S.; ISAKOV, V. V. Structural studies of polysaccharides from *Cetraria cucullata* and *Cetraria islandica* lichens. **J. Bioorg. Chem.**, v. 23, n. 2, p. 122-125, 1997.

GRUBE, M.; KROKEN, S. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. **Mycol. Res.**, v. 11, p. 1284-1294, 2000.

HALE, M.E. **How to know the lichens**. 2. ed., Iowa: Brown Company Publishers, 1979.

HALE, M. E.; FLETCHER, A. *Rimelia* Hale & Fletcher, a new lichen genus (Ascomycotina: Parmeliaceae). **Bryologist**, v. 93, p. 23-29, 1990.

HAUAN, E.; KJØLBERG, O. Studies on the polysaccharides of lichens. I. The structure of a water-insoluble polysaccharide in *Stereocaulon paschale* (L.) Fr. **Acta Chem. Scand.**, v. 25, p. 2622-2628, 1971.

HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 357-360, 1965.

HAWKSWORTH, D. L.; HILL, D. J. **The lichen forming fungi**. Glasgow: Blackie, 1984.

HAWKSWORTH, D. L.; HILL, D. J. A new name for *Dictyonema pavonium* (Swartz) Parmasto. **The Lichenologist**, v. 20, p. 101, 1988.

HOLMGREN, P. K.; HOLMGREN, N. H.; BARNETT, L. C. Index Herbariorum. 8. ed. Part I: The herbaria of the world. **Regnum Veg.**, v. 120, p. 1-693, 1990.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 110-125, 1988.

HONEGGER, R. Developmental biology of lichens. **New Phytologist**, v. 125, p. 659-677, 1993.

HONEGGER, R. Experimental studies with foliose macrolichens: fungal responses to spatial disturbance at the organismic level and to spacial problems at the cellular level during drought stress. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 569-578, 1995

HONEGGER, R. Mycobionts. In: NASH, T. H (Ed.). **Lichen Biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 24-36.

HONEGGER, R.; HAISH, A. Immunocytochemical location of the (1→3) (1→4)- β -glucan lichenin in the lichen-forming ascomycete *Cetraria islandica* (Icelandic moss). **New Phytologist**, v. 150, n. 3, p. 739-746, 2001.

HOUGH, L.; JONES, J. K.N. Chromatography on paper. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 1, p. 21-31, 1962.

HRANISAVLJEVIC-JAKOVLJEVIC, M.; MILJKOVIC-STOJANOVIC, J.; DIMITRIJEVIC, R.; MICOVIC, V.M. Water- and alkali-soluble glucans from oak lichen. **Carbohydr. Res.**, v. 39, p. 115-123, 1975.

IACOMINI, M.; SCHNEIDER, C. L.; GORIN, P. A. J. Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer moss), *Cladonia confusa*, and *Cladonia amaurocraea*. **Carbohydr. Res.**, v. 142, p. 237-251, 1985.

IACOMINI, M.; ZANIN, S. M. W.; FONTANA, J. D.; HOGGE, J.; GORIN, P. A. J. Isolation and characterization of β -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the lichen *Cora pavonia*. **Carbohydr. Res.**, v. 168, p. 55-65, 1987.

IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; BARON, M.; TULLOCH, A. P.; MAZUREK, M. Novel D-glucans obtained by dimethyl sulfoxide extraction of the lichens *Letharia vulpina*, *Actinogyra muehlenbergii*, and an *Usnea* sp. **Carbohydr. Res.**, v. 176, p. 117 - 126, 1988.

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 2.ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional. p. 100-106, 1975.

INGOLFSDOTTIR, K.; JURCIC, K.; FISCHER, B.; WAGNER, H. Immunologically active polysaccharide from *Cetraria islandica*. **Planta Medica**, v. 60, p. 527-531, 1994.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.** (Univ. of Stockholm), v. 48, p. 1-70, 1976.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 36-38, 1965.

KJØLBERG, O.; KVERNHEIM, A. L. Studies on the polysaccharides of lichens. III. The structure of alkali-soluble polysaccharides in *Umbilicaria pustulata* (L.) Hoffm. and *Umbilicaria spodochoa* (Ach.) Hoffm. **Acta Chem. Scand.**, v. 43, p. 280-285, 1989.

LEAL, J. A.; PRIETO, A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Structure and conformational features of an alkali- and water-soluble galactofuranan from the cell walls of *Eupenicillium crustaceum*. **Carbohydr. Res.**, v. 244, p. 361-368, 1993.

LINDBERG, B.; MISIORNY, A.; WACHTMEISTER, C. A. Studies on the chemistry of lichens. IV. Investigation of the low-molecular carbohydrate constituents of different lichens. **Acta Chem. Scand.**, v. 7, n. 4, p. 591-595, 1953.

LINDBERG, B.; McPHERSON, J. Studies on the chemistry of lichens VI. The structure of pustulan. **Acta Chem. Scand.**, v. 8, p. 985, 1954.

LOUWHOFF, S. H. J. J.; CRISP, M. D. Phylogenetic analysis of *Parmotrema* (Parmeliaceae: Lichenized Ascomycotina). **The Bryologist**, v. 103, p. 541-554, 2000.

MARCELLI, M.P. **Fungos liquenizados: taxonomia e características de importância taxonômica**. São Paulo, Dep. Botânica/USP, 1995.

MEYER, K. H.; GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXI. La constitution de la lichénine. **Helv. Chim. Acta**, v. 30, p. 751-761, 1947(a).

MEYER, K. H.; GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXII. L'isolichénine. **Helv. Chim. Acta**, v. 30, p. 761-765, 1947(b).

MICENO, A. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Galactomannan and isolichenan components of the carbohydrate-rich lichen *Ramalina ecklonii*. **Agric. Biol. Chem.** (Japan), v. 55, p. 1391-1392, 1991.

MITTAL, O. P.; NEELAKANTAN, S.; SESHADRI, T. R. Chemical investigations of Indian lichens. Part XIV. **Journal of Scientific and Industrial Research** (India), v. 11B, p. 386-387, 1952.

MITTAL, O. P.; SESHADRI, T. R. Chemical investigations of Indian lichens. XVI. Purification and composition of lichenin and isolichenin from Indian lichens. **Journal of Scientific and Industrial Research** (India), v. 13B, p. 344-245, 1954.

NASH, T.H.. **Lichen Biology**. Cambridge: United Kingdom, p. 225-233, 1996.

NAGAOKA, M.; HASHIMOTO, S.; SHIBATA, H.; KIMURA, I.; KIMURA, K.; SAWADA, H.; YOKOKURA, T. Structure of a galactan from cell walls of *Bifidobacterium catenulatum* YIT4016. **Carbohydr. Res.**, v. 281, p. 285-291, 1996.

NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides in lichens and fungi. Further investigation on the structures and the antitumor activity of the polysaccharides from *Gyrophora esculenta* Miyoshi and *Lasallia papulosa* (Ach.) Llano. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 17, p. 1910-1916, 1969.

NISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. Antitumor active O-acetylated pustulan-type glucans from lichens of *Umbilicaria* species. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 18, p. 1431-1434, 1970.

NISHIKAWA, Y.; MICHISHITA, K.; KURONO, G. Studies on the water soluble constituents of lichens. I. Gas chromatographic analyses of low molecular weight carbohydrates. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 21, n. 5, p. 1014-1019, 1973.

NISHIKAWA, Y.; OHKI, K.; TAKAHASHI, K.; KURANO, G.; FUKUOKA, F.; EMORI, M. Studies on the water soluble constituents of lichens. II. Antitumor polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea*, and *Cladonia* species. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 22, p. 2692-2702, 1974.

OLAFSDOTTIR, E. S.; INGOLFSDOTTIR, K.; BARSETT, H.; SMETAD P. B.; JURCIC, K.; WAGNER, H. Immunologically active (1→3) (1→4)- α -D-glucan from *Cetraria islandica*. **Phytomedicine**, v. 6, n. 1, p. 33-39, 1999.

OLAFSDOTTIR, E. S.; INGOLFSDOTTIR, K. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. **Planta Med.**, v. 67, p. 99-208, 2001.

OLAFSDOTTIR, E. S.; OMARSDOTTIR, K.; SMETAD PAULSEN, B.; WAGNER, H. Immunologically active O-6 branched (1→3)- β -D-glucan from the lichen *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. **Phytomedicine**, v. 10, p. 318-324, 2003.

PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. (Ed.). **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983. v. 2. p. 195-285.

PEREIRA, E. C.; NASCIMENTO, S.C.; LIMA, R.C.; SILVA, N.H.; OLIVEIRA, A.F.; BANDEIRA, E.; BOITARD, M.; BERIEL, H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. **Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 19, p. 47-52, 1994.

PEREYRA, M. T.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M.; LEAL, J. A. Studies of new polysaccharide from *Lasallia pustulata* (L.) Hoffm. **The Lichenologist**, v. 35, p. 177-185, 2003.

PERLIN, A. S.; CASU, B. Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-¹³C. **Tetrahedron Lett.** 34, 2919-2924, 1969.

PRADO, S. R. T.; GORIN, P. A. J.; STUELP, P. M.; HONDA, N. K.; IACOMINI, M. An unusual juxtaposition of polysaccharide components of *Collema leptosporum*. **Carbohydr. Polym.**, v. 40, 271-276, 1999.

PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; GORIN, P. A. J. A novel β -D-(1→2)-linked mannopyranan from *Crithidia deanii*. **Carbohydr. Res.**, v. 70, p. 172-174, 1979.

PRITCHARD, H., N.; BRADT, P., T. **Biology of nonvascular plants**. St. Louis: Times Mirror/Mosby College Publishing, 1984. p. 424.

PURVIS, W. **Lichens**. Singapore: Craft Print, 2000.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHEHORNS, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 206-210.

REICHER, F.; CORRÊA, J. B.C.; GORIN, P. A. J. Location of *O*-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella* (bracatinga). A study of *O*-acetyl group migration. **Carbohyd. Res.**, v. 135, p. 129-140, 1984.

REIS, R. A.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A new pullulan and a branched (1→3)-, (1→6)-linked β-glucan from the lichenized ascomycete *Teloschistes flavicans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 210, p. 1-5, 2002.

SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M.A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.**, v. 37, p. 336-343, 1954.

SASSAKI, G. L.; FERREIRA, J. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; TORRI, G.; DE TONI, F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Pustulan and branched β-galactofuranan from the phytopathogenic fungus *Guignardia citricarpa*, excreted from media containing glucose and sucrose. **Carbohyd. Polym.**, 48 (4), 385-389, 2002.

SASSAKI, G. L.; REIS, R. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The glucans of lichenized fungi. **Mitt. Inst. Allg. Bot. (Hamburg)**, v. 30, p. 195-211, 2002.

SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; TANAKA, M.; FUKUOKA, F.; NAKANISHI, M. Studies on the chemical structures of the new glucans isolated from *Gyrophora esculenta* Miyoshi and *Lasallia papulosa* (Ach.) Llano and their inhibiting effect on implanted sarcoma 180 in mice. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 16, p. 1639-1641, 1968.

SHIBATA, S. Polysaccharides of lichens. **J. Nat. Science Council Sri Lanka**, v. 1, p. 183-188, 1973.

SMITH, D. C. The symbiotic condition. **Symbiosis**, v. 14, p. 3-15, 1992.

SMRIGA, M.; SAITO, H.; SHIBATA, NARUI, T.; OKUYAMA, T.; NISHIYAMA, N. PC-2, linear homoglucon with α-linkages, peripherally enhances the hippocampal long-term potentiation. **Pharm. Res.**, v. 13, n. 9, p. 1322-1326, 1996.

SPELLMAN, M.W.; McNEIL, M.; DARVILL, A. G; ALBERSHEIM, P. Isolation and characterization of 3-C-carboxy-5-L-xylose, a naturally occurring, branched-chain, acidic monosaccharide. **Carbohydr. Res.**, v. 122, p. 115-129, 1983.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharide. In: ASPINALL, G. O. (Ed.). **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983. v. 2. p. 98-180.

STENROOS, S.; AHTI, T.; HYVÖNEN, J. Phylogenetic analysis of the genera *Cladonia* and *Cladina* (*Cladoniaceae*, lichenized *Ascomycota*). **Plant. Syst. Evol.**, v. 207, p. 43-58, 1997.

STUELP, P. M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. C.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The glucans of *Ramalina celastri*: relation with chemotypes of other lichens. **Carbohydr. Polym.**, v. 40, p.101-106, 1999.

TAKAHASHI, K.; KON, K.; YOKOTA, I.; SHIBATA, S. Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. Polysaccharides of Stereocaulaceous lichens. **Carbohydr. Res.**, v. 89, p. 166-173, 1981.

TAKEDA, T.; FUNATSU, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. Antitumor active polysaccharides of *Evernia*, *Acroscyphus* and *Alectoria* species. **Chem. Pharm. Bull.** (Japan), v. 20, p. 2445-2449, 1972.

TAKEDA, T.; NISHIKAWA, Y.; SHIBATA, S. A new α -D-glucan from the lichen *Parmelia caperata* (L.) Ach. **Chem. Pharm. Bull.** (Japan), v.18, n. 5, p. 1074-1075, 1970.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochem.**, v. 11, n. 8, p. 1383-1388, 1972.

TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Mannose-containing heteropolysaccharides of lichens: an unusual glucomannan from *Tornabenia intricata*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3467-3470, 1992.

TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Chemotypes of mannose-containing polysaccharides of lichen mycobionts: a possible aid in classification and identification. **Carbohydr. Res.**, v. 266, p. 309-314, 1995.

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, v. 166, p. 444-445, 1950.

TSCHERMAK-WOESS, E. The algal partner. In GALUN, M. (Ed.). **Handbook of Lichenology**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. I. p. 39-92.

VARTIA, K. O. Antibiotics in lichens. In: AHMADJIAN, V.; HALE, M. E. (Ed.). **The lichens**. New York: Academic Press, 1973. p. 547.

WHITON, R. S.; LAU, P.; MORGAN, S. L.; GILBART, J.; FOX, A. Modifications in the alditol acetate method for analysis of muramic acid and other neutral and amino sugars by capillary gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. **J. Chromatogr.**, v. 347, p. 109-120, 1985.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Ed.). **Meth. Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, v. 2, p. 65-68. 1963(a).

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Ed.). **Meth. Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, v. 2, p. 211-215, 1963(b).

WORANOVICZ, S. M. **Estudo comparativo de heteropolissacarídeos isolados dos líquens *Cladonia signata* (Eschw.) Vainio, *Cladonia furcata* (Hudson) Schrader e *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.** Curitiba, 1995. 109 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

WORANOVICZ, S. M.; GORIN, P. A. J.; MARCELLI, M. P.; TORRI, G.; IACOMINI, M. Structural studies on the galactomannans of lichens of the genus *Cladonia*. **The Lichenologist**, v. 29, n. 5, p. 471-481, 1997.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; TISCHER, C. A.; AHTI, T.; IACOMINI, M. Chemotyping studies on the glucans of lichens of the genus *Cladonia*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1069-1074, 1999a.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M. **Estudo comparativo de polissacarídeos e oligossacarídeos de líquens do gênero *Cladonia*.** Curitiba, 1999b. 170 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

WORANOVICZ, S. M.; PINTO, B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Novel structures in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substellata* and *Cladonia ibitipocae*: significance as chemotypes. **Phytochemistry**, v. 51, p. 395-402, 1999c.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, P. L.; MARCELLI, M. P.; IACOMINI, M. Galactomannoglucans of lichenized fungi of *Cladonia* spp.: significance as chemotypes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 52, p. 313-317, 1999d.

XAVIER – FILHO, L.; RIZZINI, C.T. **Manual de liquenologia brasileiro**. Recife, Universidade Federal do Pernambuco; 431 p., 1976.

YOKOTA, I.; SHIBATA, S. A polysaccharide of the lichen, *Stereocaulon japonicum*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 26, p. 2668-2670, 1978.

YOKOTA, I.; SHIBATA, S.; SAITÔ, H.A. ¹³C-n.m.r. analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens. **Carbohydr. Res.**, v. 69, p. 252-258, 1979.

ZANIN, S. M. W.; FONTANA, J. D.; HOGGE, L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Isolation and characterization of β -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the basidiomycetous lichen *Cora pavonia*. **Carbohydr. Res.**, v. 168, p. 55-65, 1987.

PUBLICAÇÕES

CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A (1→6)-linked β -mannopyranan, pseudonigeran, and a (1→4)-linked β -xylan, isolated from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*. *FEMS Microbiological Letters*. v. 206, n.02, p.175 - 178, 2002. (ANEXO 1)

CARBONERO, E. R.; MONTAI, A. V.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladina* spp.: significance as chemotypes. *Phytochemistry*. v. 61, p. 681 - 686, 2002. (ANEXO 2)

CARBONERO, E. R.; TISCHER, C. A.; COSENTINO, C.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization of a galactomannan from the cyanolichen *Leptogium azureum*. *Carbohydrate Polymers*. v. 53, p.469 - 473, 2003. (ANEXO 3)

CARBONERO, E. R.; MONTAI, A. V.; MELLINGER, C. G.; ELIASARO, S.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Glucans of lichenized fungi: their significance in chemotyping the genera *Parmotrema* and *Rimelia*. *Phytochemistry*, 2004 (trabalho aceito à publicação). (ANEXO 4)

CARBONERO, E. R.; MELLINGER, C. G.; ELIASARO, S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemotypes significance of lichenized fungi by structural characterization of heteropolysaccharides from the genera *Parmotrema* and *Rimelia*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004. (trabalho submetido à publicação) (ANEXO 5)

CARBONERO, E. R.; CORDEIRO, L. M. C.; MELLINGER, C. G.; SASSAKI, G. L.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Galactomannans with novel structures from the lichen *Rocella decipiens* Darb. *Carbohydrate Research*, 2004. (trabalho submetido à publicação) (ANEXO 6)

CARBONERO, E. R.; SMIDERLE, F. R.; GRACHER, A. H. P.; MELLINGER, C. G.; AHTI, T.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structure of two glucans and a galactofuranomannan from the lichen *Umbilicaria mammulata* (Ach.) Tuck. Gier Kendrick. *Carbohydrate Polymers*, 2004. (trabalho submetido à publicação) (ANEXO 7)

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a β -(1→6)-linked glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale. *Carbohydrate Polymers*, 2004. (trabalho aceito à publicação) (ANEXO 8)

ANEXOS



Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladina* spp.: significance as chemotypes

Elaine R. Carbonero^a, Anderson V. Montai^a, Sandra M. Woranovicz-Barreira^b, Philip A. J. Gorin^a, Marcello Iacomini^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, C.P.19046, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil

^bDepartamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, 3,400 Rua Prefeito Lothário Meissner, CEP 80210-170, Curitiba, PR, Brazil

Received 7 May 2002; received in revised form 8 July 2002

Abstract

The chemical structures of nigerans, an α -glucan, laminarans, a β -glucan, galactoglucomannans and galactomannoglucans of three species of *Cladina*, namely *C. arbuscula*, *C. confusa* and *C. substenius*, were determined and compared. According to chemical and spectroscopic analyses, the glucans investigated to date, which have been isolated in 15 *Cladonia* species, as well as the galactomannoglucans and galactoglucomannans, have similar principal structures. This suggests that, in terms of polysaccharide structure, *Cladonia* and *Cladina* genera do not show differences. DNA studies support this idea and it is proposed that *Cladina* be reduced to a synonym under *Cladonia*.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Lichenized fungi; *Cladina* spp.; Chemotaxonomy; Polysaccharides; Structure

1. Introduction

Of the 13,500 lichenized fungi species growing worldwide, no more than 100 species have been investigated for their carbohydrate compositions. The best known polymers of lichens are lichenan, isolichenan, galactomannan, and the recently described galactomannoglucans (Woranovicz-Barreira et al., 1999b; Carbonero et al., 2001), which can be useful in chemotaxonomic studies (Gorin et al., 1993; Teixeira et al., 1995; Woranovicz-Barreira et al., 1999b). In lichenized fungi, large genera are usually divided into subgenera and then again into sections, which include very closely related species. According to classic taxonomy, *Cladina* was a subgenus of the *Cladonia* genus and thereafter lichenologists decided to consider it as a distinct genus. On the basis of molecular phylogenetic results, Ahti and Depriest (2001) proposed that lichens currently placed in the segregated genus *Cladina* be transferred to the genus *Cladonia*, and that *Cladina* becomes a synonym of *Cladonia*.

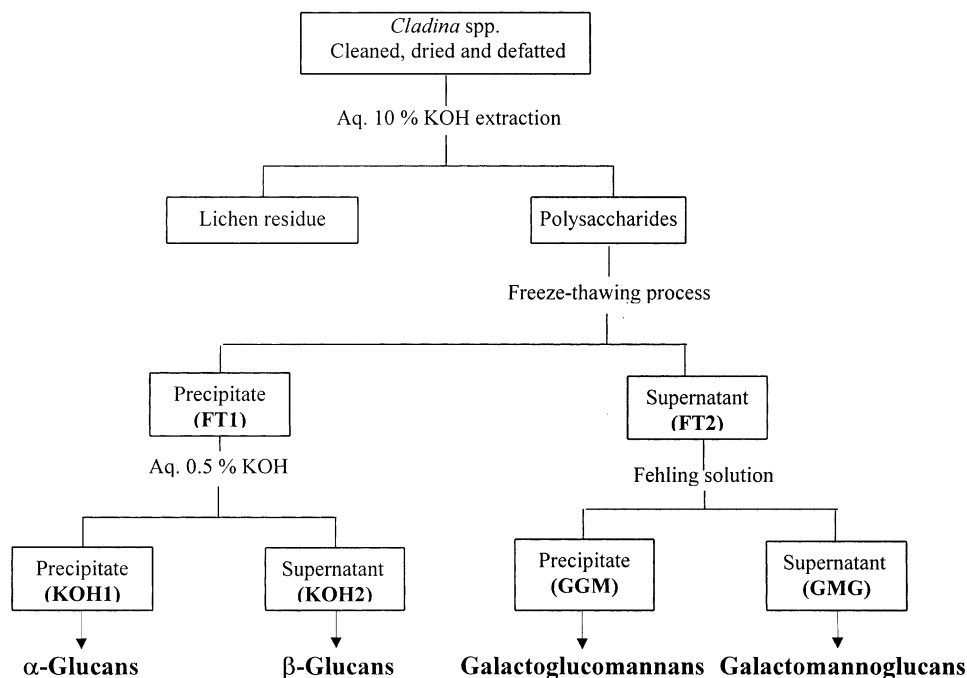
Studies on polysaccharide components showed that nigeran occurred in several *Cladonia* spp. (Nishikawa et al., 1974; Woranovicz-Barreira et al., 1999a), and also in four *Cladina* spp. (Nishikawa et al., 1974; Iacomini et al., 1985). Related galactoglucomannans were also found in these separate genera. In this study, β -D-Glucans and galactomannoglucans, which were suggested as markers for lichen identification in the *Cladonia* genus (Woranovicz-Barreira, 1999a; Carbonero et al., 2001), were found in the three *Cladina* spp. examined. These polysaccharides are thus useful chemical markers in lichen identification and for confirmation of DNA studies.

2. Results and discussion

The extracts of each lichen species, obtained by treatment with organic solvents and 10% aq. KOH at 100 °C, were neutralized, treated with excess ethanol and the precipitate obtained was resuspended in water, frozen, and then thawed, resulting in the formation of a precipitate (FT1) and soluble material (FT2) (Scheme 1). FT1 was resuspended with 0.5% aq. KOH at 50 °C,

* Corresponding author. Tel.: +55-41-361-1655; fax: +55-41-266-2042.

E-mail address: iacomini@bio.ufpr.br (M. Iacomini).

Scheme 1. Extraction and purification of polysaccharides of *Cladina* spp.

which also gave two fractions, one insoluble (KOH1) and the other soluble (KOH2) under these conditions.

2.1. (1→3),(1→4)-Linked α-glucans (KOH1)

Products with a high content of glucose were obtained (FT1, Table 1). After purification, each KOH1 fraction from the three species (yields ~2%) gave rise to ¹³C NMR spectra with 12 signals (Fig. 1; Table 2), arising from an α-D-glucan with alternating (1→3)- and (1→4)-linkages in a 1:1 ratio, previously found in various *Cladonia* spp. (Woranovicz-Barreira et al., 1999a; Carbonero et al., 2001), and also in four species of the *Cladonia* genus (Iacomini et al., 1985; Nishikawa et al., 1974). Many other α-glucans, isolated using the freeze-thawing process, have been studied. Except for that of *Flavoparmelia caperata*, all displayed different (1→3)- and (1→4)-linkage ratios, varying between 2:1 and 3:1

(Gorin et al., 1988). We thus suggest that the 1:1 ratio and other parameters could be used as a marker to aid lichen taxonomy. To check whether this polysaccharide is a “fingerprint” in *Flavoparmelia* spp., other species should be investigated, considering that only one has been studied so far.

2.2. (1→3)-Linked β-glucans (KOH2)

β-D-Glucans of the laminaran type are polysaccharides insoluble in cold water and are formed as a precipitate in the freeze-thawing process, arising from 15 *Cladonia* spp. (Carbonero et al., 2001). This indicates that they should be present in all lichens of this genus. Indeed, the freeze-thawing process carried out on extracts of three *Cladonia* spp. gave rise to identical glucans in the KOH2 fraction of the aq. 0.5% KOH treatment (yield ~0.4%). Their ¹³C NMR spectra (Fig. 2;

Table 1
Monosaccharide composition and yields of polysaccharides obtained from *Cladonia* spp.

Lichen	Freeze-thawing treatment				Fehling treatment			
	Precipitate (FT1)		Supernatant (FT2)		Precipitate (GGM)		Supernatant (GMG)	
	(%) ^b Man:Gal:Glc	Yield (%) ^b	(%) ^a Man:Gal:Glc	Yield (%) ^b	(%) ^a Man:Gal:Glc	Yield (%) ^b	(%) ^a Man:Gal:Glc	Yield (%) ^b
<i>C. arbuscula</i>	2:0:98	2.5	63:32:5	8.5	57:40:3	3.2	41:47:12	1.5
<i>C. confusa</i>	1:1:98	3.1	60:32:8	15.3	63:32:5	11.0	40:49:11	3.4
<i>C. substenius</i>	0:1:99	1.6	58:36:6	10.9	55:41:4	3.2	47:40:13	3.4

^a Derived alditol acetates analyzed by GC–MS.

^b Yields based on dry lichen.

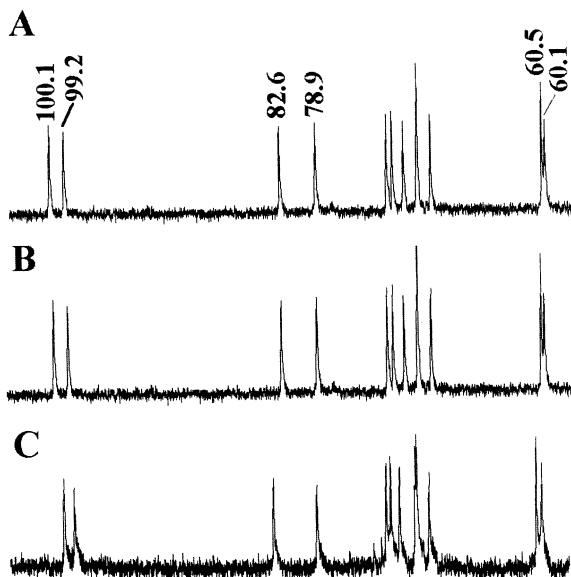


Fig. 1. ^{13}C NMR spectra of nigerans (KOH1) in $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ at 70°C (chemical shifts are expressed as δ ppm) obtained from *Cladina arbuscula* (A), *C. confusa* (B), and *C. substenius* (C).

Table 2

Proton and ^{13}C chemical shifts (δ) of nigerans (KOH1) and laminarans (KOH2), obtained from *Cladina* spp.

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ nuclei	KOH1				KOH2	
	(1 \rightarrow 4)- α -Glc		(13)- α -Glc		(1 \rightarrow 3)- β -Glc	
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)
H-1/C-1	5.23	100.1	5.14	99.2	4.55	102.9
H-2/C-2	3.55	70.6	3.48	71.9	3.31	72.9
H-3/C-3	3.73	72.6	3.70	82.6	3.49	86.2
H-4/C-4	3.57	78.9	3.52	69.5	3.27	68.4
H-5/C-5	3.88	73.1	4.03	70.5	3.27	76.3
H-6/C-6	3.63	60.5	3.76	60.1	3.48/3.72	60.8

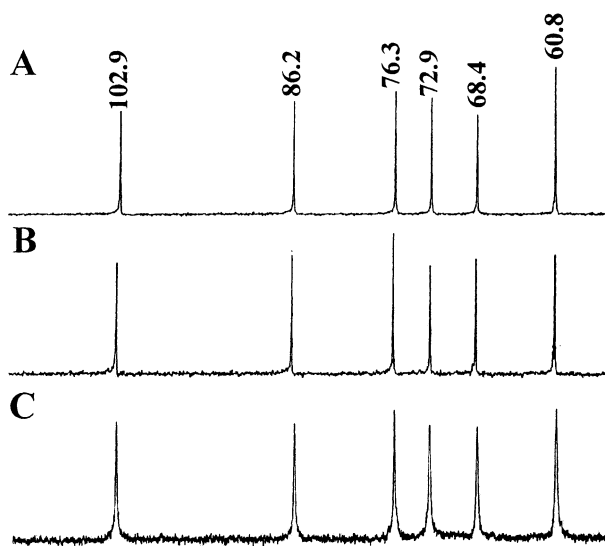


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of laminaran (KOH2) in $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ at 70°C (chemical shifts are expressed as δ ppm) obtained from *Cladina arbuscula* (A), *C. confusa* (B), and *C. substenius* (C).

Table 2) containing six signals of equal magnitude, are identical to that of an authentic (1 \rightarrow 3)-linked β -glucan. These were also obtained in low yields from *Stereocaulon ramulosum* (Baron et al., 1988) and *Ramalina celastri* (Stuelp et al., 1999). One common factor in the analyzed lichens is that they all contain *Trebouxia* sp. (family Chlorophyceae) as a photobiont, suggesting that it might be the source of this β -glucan and can be used as a marker to aid the classic taxonomy of lichenized fungi. This polysaccharide has also been proposed as a morphological characteristic of cladoniform lichens (Gorin et al., 1988; Stenroos and Depriest, 1998).

2.3. Galactoglucomannans (GGM)

The GGM fraction was obtained via Fehling precipitation from FT2. Heteropolysaccharides from *C. arbuscula* (yield 3.2%), *C. confusa* (yield 11.0%) and *Cladina substenius* (yield 3.2%) each having M_r 1.9×10^6 , and mannose, galactose and glucose in ratios of 57:40:3, 63:32:5, and 55:41:4 respectively, were superficially similar. Their ^{13}C NMR spectra (Fig. 3) showed major signals in common, but had minor differences typical of the species. In general, we have found that such ^{13}C NMR spectra correspond to the lichen species (Woranicov et al., 1997, 1999), to the extent that they were used for classification and identification (Teixeira et al., 1995).

Methylation analysis showed complex structures with formation of at least 10 significant, partially *O*-methylated alditol acetates (Table 3), which indicates structures with similarities to those of heteropolysaccharides of the *Cladonia* and *Cladina* spp. (Iacomini et al., 1985; Woranicov et al., 1997, 1999) [this complexity was reflected in the ^{13}C NMR spectra, which contain many signals in the C-1 region (Fig. 3)]. These signals corresponded, according to the methylation data (Table 3), to nonreducing end-groups of Galp and Manp (*C. confusa* showed the highest percentage of Manp, 20%, among in the three species), and Manp units substituted at O-2, O-6, O-4,6 (in this case, the *C. confusa* polymer had the lowest content), O-2,6 and O-2,4,6. Moreover, the *C. confusa* polysaccharide presented Galp units substituted at O-3, differ from *C. arbuscula* and *C. substenius*, which had them substituted at O-4.

The ^{13}C NMR spectra of the three GGM (Fig. 3), contained C-1 signals that indicated predominant branched structures with nonreducing end-units of β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Manp (δ 104.3), α -D-Galp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp (δ 102.8), and also α -D-Manp (δ 103.3) linked (1 \rightarrow 2) to α -D-Manp units, along with 2,4-di-*O*-substituted (δ 101.7) (Gorin and Iacomini, 1984, 1985), 6-*O*- (δ 100.5) and 2,6-di-*O*-substituted (δ 99.3) units of α -D-Manp from the polysaccharide core (Gorin, 1973).

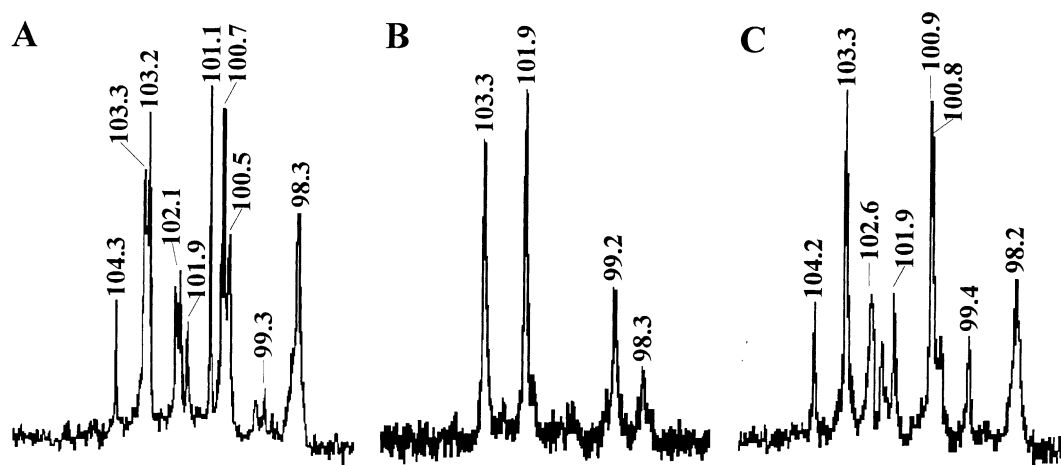


Fig. 3. ^{13}C NMR spectra of the galactoglucomannans (GGM) in D_2O at 30°C (chemical shifts are expressed as δ ppm), obtained from *Cladina arbuscula* (A), *C. confusa* (B), and *C. substenius* (C).

Table 3

Linkage types based on analysis of partially *O*-methyl alditol acetates obtained from methylated galactoglucomannans (GGM) isolated from *Cladina* spp.^a

Linkage type ^b	GGM		
	<i>C. arbuscula</i>	<i>C. confusa</i>	<i>C. substenius</i>
Manp-(1→	8	20	11
Galp-(1→	29	24	27
→2)-Manp-(1→	9	4	7
→3)-Glc p-(1→	—	1	—
→4)-Manp-(1→	3	2	1
→3)-Galp-(1→	—	6	—
→6)-Manp-(1→	5	5	7
→4)-Galp-(1→	11	2	14
→4)-Glc p-(1→	3	4	4
→4,6)-Manp-(1→	12	4	11
→2,6)-Manp-(1→	9	12	7
→2,4,6)-Manp-(1→	11	16	11

^a % Of peak area of *O*-methylallditol acetate relative to total area (GC-MS).

^b Based on derived *O*-methylallditol acetates.

2.4. Galactomannoglucans (GMG)

The mother liquors, obtained after Fehling precipitation, gave similar homogeneous polysaccharides (yields: 1.5% in *C. arbuscula* and 3.4% for the two other species, M_r 1.75×10^6). They have similarities in their ^{13}C NMR spectra (Fig. 4) and Man, Gal, Glc ratios of 41:47:12 (*C. arbuscula*), 40:49:11 (*C. confusa*), and 47:40:13 (*C. substenius*), respectively.

The ^{13}C NMR spectra of each GMG showed a complex side-chain structure with C-1 signals of β -Galp at δ 106.0–108.3 (Gorin et al., 1981). This agreed with the methylation data, which showed 16–26% of Galp non-reducing end units (Table 4). This analysis also showed that the side-chains were branched (with 2-*O*-, 4-*O*-, 6-*O*-, 2,3-di-*O*-substituted Manp; 6-*O*-, 3,6-di-*O*-substituted Galp units; and 2,3,6-tri-*O*-substituted Glcp

units) being present in all investigated *Cladina* spp. These results coincide with those obtained for several species of the genus *Cladonia* (Woranovicz-Barreira et al., 1999b), which gave rise to virtually identical ^{13}C NMR spectra and methylation data, i.e. galactomannoglucans with (1→3)-linked main chains of β -D-Glc p, substituted at O-2,6 principally by side chains of Galp and Manp units.

In contrast, the only galactan isolated from this fraction was obtained from a *Cladina stellaris* fraction (Iacomini et al., 1985). Perhaps this species should be further studied, as *Cladina confusa* also contained a galactan, but no galactomannoglucan. *Cladia aggregata*, which belongs to the same family, did not have this heteropolysaccharide (data not shown). It is known that it is not related to the genus *Cladonia* as is *Cladina*. The present data suggest that the *Cladonia* and *Cladina* genera have the same heteropolymer contained in the Fehling supernatant.

3. Conclusion

These results, along with DNA studies (Ahti and Depriest, 2001), now suggest that *Cladina* must be classified within the genus *Cladonia*.

4. Experimental

4.1. Lichenized fungi

Cladina arbuscula (Wallr.) Hale & W. L. Culb. was collected in Finland, Province of Uusimaa. *Cladina confusa* (Sant.) Follm. & Ahti, from the Ilha do Mel, State of Paraná, Brazil, and *Cladina substenius* (Abbeyes) Hale & W. L. Culb. in Massachusetts, USA. The three samples were collected in 1998, and have their vouchers deposited in the UPCB (Herbarium of the

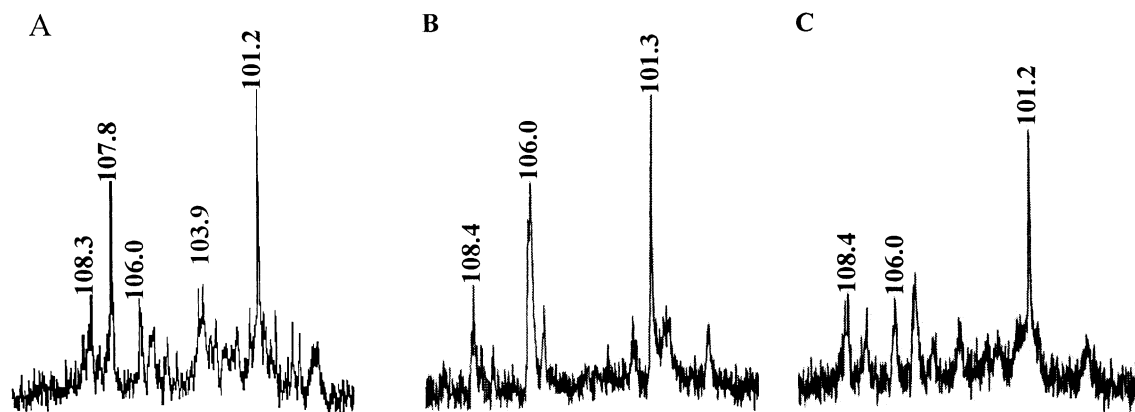


Fig. 4. ^{13}C NMR spectra of the galactomannoglucans (GMG) in D_2O at 30°C (chemical shifts are expressed as δ ppm), obtained from *Cladina arbuscula* (A), *C. confusa* (B), and *C. substenius* (C).

Table 4

Linkage types based on analysis of partially *O*-methyl alditol acetates obtained from methylated galactomannoglucans (GMG) isolated from *Cladina* spp.^a

Linkage type ^b	GMG		
	<i>C. arbuscula</i>	<i>C. confusa</i>	<i>C. substenius</i>
Manp-(1→	5	3	4
Galf-(1→	22	26	16
Galp-(1→	10	9	12
→2)-Manp-(1→	16	9	19
→2)-Glc-(1→	3	2	4
→3)-Manp-(1→	—	3	—
→4)-Manp-(1→	7	6	11
→6)-Manp-(1→	2	5	6
→6)-Galf-(1→	7	6	6
→2,3)-Manp-(1→	7	8	5
→3,4)-Galp-(1→	3	—	—
→4,6)-Manp-(1→	4	2	1
→2,6)-Manp-(1→	—	2	2
→4,6)-Galp-(1→	—	3	2
→3,6)-Galp-(1→	5	5	4
→2,3,6)-Glc-(1→	10	9	9

^a % Of peak area of *O*-methylallditol acetate relative to total area (GC–MS).

^b Based on derived *O*-methylallditol acetates.

Federal University of Paraná), registration numbers 45901, 35700, 45900, respectively.

4.2. General analytical methods

Evaporations were carried out under reduced pressure at 30°C . Gas liquid chromatography–mass spectrometry (GC–MS) was performed using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap, model 810 R-12 mass spectrometer, with a DB-225 capillary column (30×0.25 mm i.d.) held at 50°C for injection, and then programmed at $40^\circ\text{C}/\text{min}$ to 220°C (constant temp), with He as carrier gas. Paper chromatography was carried out using Whatman No. 1 filter paper (solvent: *n*-BuOH–pyridine– H_2O , 5:3:3, v/v), with glucose as standard; sugars

being detected by the acetone– AgNO_3 dip method (Trevelyan et al., 1950). The phenol– H_2SO_4 method (Dubois et al., 1956) was used for quantitative sugar determinations.

4.3. Isolation and purification of polysaccharides

Lichen samples (*C. arbuscula*, 36 g; *C. confusa*, 37 g; *C. substenius*, 80 g) were refluxed (2 h) successively in CHCl_3 –MeOH (2:1 v/v) and 80% aq. MeOH, in order to extract low molecular components. The residual material (24.0 g, 26.5 g and 55.0 g for *C. arbuscula*, *C. confusa* and *C. substenius*, respectively) was then extracted three times with 10% aq. 10% aq. KOH (300 ml) containing a trace of NaBH_4 at 100°C for 3 h. The combined extracts were neutralized with HOAc, dialyzed against tap water for 72 h, and the retained solution was frozen and thawed to give a precipitate (FT1) and supernatant (FT2). The FT1 fraction (*C. arbuscula*, 0.9 g; *C. confusa*, 1.1 g; *C. substenius* 1.3 g) consisted of a mixture of (1→3), (1→4)-linked α -glucan and (1→3)-linked β -glucan, which was isolated and suspended with stirring in 0.5% aq. KOH at 50°C , which dissolved the β - (KOH2), but not the α -glucan (KOH1). The FT2 fraction (*C. arbuscula*, 3.1 g; *C. confusa*, 5.7 g; *C. substenius* 8.7 g) was then treated with Fehling solution (Jones and Stoodley, 1965), and resulting precipitates of Cu complexes removed. Each fraction was neutralized with HOAc, dialyzed against tap water and deionized with mixed ion exchange resins, giving rise to galactoglucomannans (Cu^{++} -Ppt; GGM) and galactomannoglucan (Cu^{++} -Sup; GMG).

4.4. Monosaccharide composition

The polysaccharides were hydrolyzed with 1 M TFA at 100°C for 8 h, followed by evaporation to dryness and successive reduction with NaBH_4 and acetylation with Ac_2O – NaOAc at 120°C for 1 h. The Ac_2O was destroyed with ice-water, and the resulting alditol acetates extracted with CHCl_3 (Whiton et al., 1985) and analyzed by GC–MS, as described above.

4.5. Methylation analysis

Ten milligrams of each purified fraction, were per-*O*-methylated using powdered NaOH in Me₂SO–MeI (Ciucanu and Kerek, 1984). The per-*O*-methylated derivatives were treated with refluxing 3% HCl–MeOH for 2 h at 80 °C, then 0.5 M H₂SO₄ at 100 °C for 14 h, and the resulting mixtures of *O*-methyl aldoses, as described above, were then reduced with NaBH₄ and acetylated to give partially *O*-methylated alditol acetates, which were analyzed by GC–MS.

4.6. HPSEC analysis

The elution profiles of water-soluble fractions were determined by high performance size-exclusion chromatography (HPSEC), using a WATERS 510 HPLC pump at 0.6 ml/min with four gel permeation columns in series with exclusion sizes of 1×10⁶, 4×10⁵, 8×10⁴, and 5×10³ Da, using a refraction index (RI) detector. The eluent was 0.1 M/l aq. NaNO₃ containing 200 ppm aq. NaN₃. Samples, previously filtered through a membrane (0.22 µm; Millipore), were injected (250 µl loop) at 1 mg/ml concentration.

4.7. ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy

1D ¹H, ¹³C NMR spectroscopic experiments were obtained using a 400 MHz Brüker model DRX Avance spectrometer incorporating Fourier transform. ¹³C NMR (100.6 MHz) and ¹H NMR (400.13 MHz) analyses were performed at 70 or 30 °C, with the samples being dissolved in D₂O or in Me₂SO-*d*₆ depending on their solubility. The OH groups were exchanged with D₂O followed by freeze drying. Chemical shifts of water-soluble samples are expressed in δ ppm relative to acetone at δ 30.20 and 2.22 for ¹³C and ¹H signals, respectively and at δ 39.70 (¹³C) and 2.40 (¹H) for those soluble in Me₂SO-*d*₆.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Teuvo Ahti for identification and supplying part of the material (*C. arbuscula* and *C. substenius*), the Brazilian agencies, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX-CARBOIDRATOS and PADCT II/SBIO for financial assistance, and the Istituto di Chimica e Biochimica J. Ronzoni, Milan, Italy, for preparation of ¹³C NMR spectra.

References

Ahti, T., Depriest, P.T., 2001. New combination of *Cladonia* epithets in *Cladonia* (Ascomycotina, Cladoniaceae). Mycotaxon. 78, 499–502.
Baron, M., Gorin, P.A.J., Iacomini, M., 1988. Isolation and identification of a linear (1→3)-linked β-D-glucan and other carbohydrate

components of the lichen *Stereocaulon ramulosum* (Sw.). Räusch. Carbohydr. Res. 177, 235–239.
Carbonero, E.R., Sasaki, G.L., Stuelp, P., Gorin, P.A.J., Woranovicz-Barreira, S.M., Iacomini, M., 2001. Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. FEMS Microbiol. Lett. 194, 65–69.
Ciucanu, I., Kerek, F., 1984. Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydr. Res. 131, 209–217.
Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350–356.
Gorin, P.A.J., 1973. Rationalization of carbon-13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. Can. J. Chem. 51, 2375–2383.
Gorin, P.A.J., Iacomini, M., 1984. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. Carbohydr. Res. 128, 119–132.
Gorin, P.A.J., Iacomini, M., 1985. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. Carbohydr. Res. 142, 253–267.
Gorin, P.A.J., Baron, M., Iacomini, M., 1988. Storage products of lichens. In: Galun, M. (Ed.), CRC Handbook of Lichenology. CRC Press, Florida, pp. 9–23.
Gorin, P.A.J., Baron, M., da Silva, M.L.C., Teixeira, A.Z.A., Iacomini, M., 1993. Lichen carbohydrates. Ciência e Cultura (Brazil) 45, 27–36.
Gorin, P.A.J., Barreto-Bergter, E.M., da Cruz, F.S., 1981. Chemical structure of de D-galacto D-mannan component of *Trypanosoma cruzi*: C-13 NMR shift dependence on structure of D-mannose to D-galactose linkage. Carbohydr. Res. 88, 177–188.
Iacomini, M., Schneider, C.L., Gorin, P.A.J., 1985. Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer moss), *Cladonia confusa*, and *Cladonia amaurocraea*. Carbohydr. Res. 142, 237–251.
Jones, J.K.N., Stoodley, R.J., 1965. Fractionation using copper complexes. Methods Carbohydr. Chem. 5, 36–38.
Nishikawa, Y., Ohki, K., Takahashi, K., Kurano, G., Fukuoka, F., Emori, M., 1974. Studies on the water soluble constituents of lichens. II. Antitumor polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea*, and *Cladonia* species. Chem. Pharm. Bull. 22, 2692–2702.
Stenroos, S.K., Depriest, P.T., 1998. T.SSU rDNA phylogeny of Cladoniform lichens. Am. J. Bot. 85, 1548–1559.
Stuelp, P.M., Carneiro Leão, A.M.C., Gorin, P.A.J., Iacomini, M., 1999. The glucans of *Ramalina celastri*: relation with chemotypes of other lichens. Carbohydr. Polym. 40, 101–106.
Teixeira, A.Z.A., Iacomini, M., Gorin, P.A.J., 1995. Chemotypes of mannose-containing polysaccharides of lichen mycobionts: a possible aid in classification and identification. Carbohydr. Res. 266, 309–314.
Trevelyan, W.E., Procter, D.P., Harrison, J.S., 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature 166, 444–445.
Whiton, R.S., Lau, P., Morgan, S.L., Gilbert, J., Fox, A., 1985. Modifications in the alditol acetate method for analysis of muramic acid and other neutral and amino sugars by capillary gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. J. Chromatogr. 347, 109–120.
Woranovicz-Barreira, S.M., Gorin, P.A.J., Marcelli, M., Torri, G., Iacomini, M., 1997. Structural studies on the galactomannans of lichens of the genus *Cladonia*. The Lichenologist 29, 471–481.
Woranovicz, S.M., Pinto, B.M., Gorin, P.A.J., Iacomini, M., 1999. Novel structures in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substellata* and *Cladonia ibitipocae*: significance as chemotypes. Phytochemistry 51, 395–402.
Woranovicz-Barreira, S.M., Gorin, P.A.J., Sasaki, G.L., Tischer, C.A., Ahti, T., Iacomini, M., 1999a. Chemotyping studies on the glucans of lichens of the genus *Cladonia*. Phytochemistry 52, 1069–1074.
Woranovicz-Barreira, S.M., Gorin, P.A.J., Sasaki, P.L., Marcelli, M.P., Iacomini, M., 1999b. Galactomannoglucans of lichenized fungi of *Cladonia* spp.: significance as chemotypes. FEMS Microbiol. Lett. 181, 313–317.

A (1 → 6)-linked β -mannopyrananan, pseudonigeran, and a (1 → 4)-linked β -xylan, isolated from the lichenised basidiomycete *Dictyonema glabratum*

Elaine R. Carbonero, Guilherme L. Sassaki, Philip A.J. Gorin, Marcello Iacomini *

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, C.P. 19046, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

Received 5 September 2001; received in revised form 25 October 2001; accepted 25 October 2001

First published online 22 November 2001

Abstract

Extraction of *Dictyonema glabratum* with hot 2% (w/v) aqueous KOH at 100°C, followed by neutralisation and freeze-thawing, gave an insoluble glucan. The residue was further extracted by a similar process, but with hot 10% (w/v) aqueous KOH, furnishing a mixture of glucan, mannan and xylan. The mannan and xylan were obtained via precipitation of its copper complex with Fehling's solution, leaving the glucan in the supernatant. The insoluble complex was finally purified through gel permeation chromatography. Methylation analysis, one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance examination showed the polysaccharides to be a (1 → 3)-linked α -glucan (pseudonigeran) and a (1 → 4)-linked β -xylan, both not previously encountered in lichens, and a newly discovered (1 → 6)-linked β -mannan. © 2002 Published by Elsevier Science B.V. on behalf of the Federation of European Microbiological Societies.

Keywords: Lichenized fungus; *Dictyonema glabratum*; Polysaccharide; α -D-Glucan; β -D-Mannan; β -D-Xylan; Nuclear magnetic resonance

1. Introduction

Most glucans isolated from lichenised ascomycetous fungi have linear structures, having α - or β -glycosidic configurations [1,2]. In the majority of studied lichens, the glucans were isolated by virtue of their solubility or insolubility in cold water. Water-insoluble α -D-glucans containing alternate (1 → 3)- and (1 → 4)-linkages (nigeran = myco-dextran) have been isolated from the genus *Cladonia* [3], and linear (1 → 3)-linked β -D-glucans (1 → 3) have been obtained from ascolichens of *Cladonia* spp. [4]. However, the basidiolichen *Dictyonema glabratum* (formerly *Cora pavonia*, *Cora montanensis*, *Cora pavonium*, and *Dictyonema pavonium* [5]) contains a highly branched β -D-glucan containing (1 → 3)- and (1 → 6)-linkages [6], distinguishing it from the linear glucans of ascomycetous lichens [3] and free ascomycetes [7]. Branched, mannose-containing poly-

saccharides are present in all lichens, having (1 → 6)-linked α -mannopyranosyl main chains substituted at O-2 and/or O-4 by a wide variety of monosaccharide units [1,2], distinguishing them from that of *D. glabratum*, which contains a (1 → 3)-linked α -mannopyranosyl main chain, mainly substituted at O-2 and/or O-4 with β -D-xylopyranosyl units [6]. We now report the isolation and characterisation from the basidiolichen *D. glabratum* (Sprengel) D. Hawks (family: Dictyonemataceae) [6] of three linear homopolysaccharides not found to date as lichen components, one of them being a novel (1 → 6)-linked β -mannopyranan.

2. Materials and methods

2.1. Isolation and purification of polysaccharides

A cleaned sample of *D. glabratum* (43 g) was extracted successively with refluxing CHCl_3 –MeOH (2:1 v/v) and 80% aqueous MeOH, in order to extract low-molecular-mass components. The residual material was then extracted three times with 2% aq. KOH (500 ml) containing a trace of NaBH_4 at 100°C for 2 h. The combined extracts were neutralised with HOAc, dialysed against tap water

* Corresponding author. Tel.: +55 (41) 366-3372;
Fax: +55 (41) 266-2042.
E-mail address: iacomini@bio.ufpr.br (M. Iacomini).

for 72 h, and the retained solution was freeze-thawed to give a precipitate [PptF/T-2% (glucan)]. The residual lichen was then extracted with 10% aq. KOH (500 ml) and the process repeated giving a precipitate (PptF/T-10%), which was added to dimethylsulfoxide (DMSO; 50 ml) and refluxed for up to 2 h at 100°C, resulting in partial dissolution. The solution containing mannan, xylan and traces of glucan (DMSO-Sup) was dialysed and insoluble material (DMSO-Ppt) was not further examined. Treatment of the DMSO-Sup with Fehling's solution (50 ml) precipitated the mannan and xylan, their Cu^{2+} complex being removed appropriately. The glucan remained in the supernatant. Each fraction was neutralised with HOAc, dialysed against tap water and deionised with mixed ion exchange resins, giving rise to mannan and xylan [Cu^{2+} -Ppt] and glucan (Cu^{2+} -Sup).

2.2. General analytical methods

Evaporations were carried out under reduced pressure at 30°C. Gas liquid chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was performed using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap, model 810 R-12 mass spectrometer, with a DB-225 capillary column (30 m×0.25 mm i.d.) held at 50°C for injection, and then programmed at 40°C min⁻¹ to 230°C (constant temperature), with He as carrier gas. Paper chromatography was carried out using Whatman No. 1 filter paper (solvent: *n*-BuOH–pyridine–H₂O 5:3:3 v/v), with glucose as standard; sugars were then detected by the acetone–AgNO₃ dip method [8]. The phenol–H₂SO₄ method [9] was used for quantitative sugar determinations.

2.3. Monosaccharide composition

The polysaccharides were hydrolysed with 1 M trifluoroacetic acid at 100°C for 8 h, followed by evaporation to dryness and successive reduction with NaBH₄ and acetylation with Ac₂O–NaOAc at 120°C for 1 h. The Ac₂O was destroyed with ice-water, and the resulting alditol acetates extracted with CHCl₃ [10] and analysed by GC-MS, as described above.

2.4. Methylation analysis

Per-*O*-methylation of the isolated polysaccharides was carried out using powdered NaOH in DMSO–MeI [11]. The products were converted into partially *O*-methylated aldose acetates by successive treatments with refluxing 2% MeOH–HCl for 2 h and total hydrolysis with 0.5 M H₂SO₄ for 14 h at 100°C, neutralised (BaCO₃), filtered, and the filtrate evaporated to dryness. The products were converted into partially *O*-methylated alditol acetates as described above, and analysed by GC-MS.

2.5. Determination of homogeneity and molecular mass of the polysaccharides

Each polysaccharide (2.0 mg) was dissolved in 1 M NaOH (0.5 ml), and the solution applied to a column of Sepharose CL-6B (32 cm×1.0 i.d.). It was eluted with 0.1 M NaOH and resulting fractions of 1 ml were tested for carbohydrates [9]. The column was calibrated for molecular mass using dextrans with *M_r* values of 40.2×10³, 77.8×10³, 2.66×10⁵ and 4.78×10⁵ (Fig. 1).

2.6. ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

One-dimensional ¹H, ¹³C-NMR and DEPT as well as two-dimensional HMQC (¹H observe, ¹³C) experiments were obtained using a 400-MHz Bruker model DRX Avance spectrometer incorporating Fourier transform. Samples were dissolved in 1% NaOD in D₂O or DMSO-d₆ and examined at 30°C. Chemical shifts (δ in ppm) are expressed relative to resonance of Me₄Si (TMS; δ =0).

3. Results and discussion

Defatted lichen, containing 4.9% lipids and other low-molecular-mass material, was extracted with 2% aqueous KOH at 100°C and following neutralisation, was subjected to freezing, followed by gentle thawing. The precipitate (PptF/T-2%) contained 94% glucose (Table 1) and precip-

Table 1
Monosaccharide composition of fractions obtained in each purification step

Fraction	Yield (%) ^b	Monosaccharides (%)		
		Glc ^c	Xyl ^c	Man ^c
PptF/T-2% (glucan) ^a	0.8	94	4	2
PptF/T-10%	2.3	58	38	4
DMSO-Sup	0.6	6	64	30
DMSO-Ppt	1.7	64	19	17
Cu ²⁺ -Ppt (mannan and xylan)	0.56	–	68	32
Cu ²⁺ -Sup (glucan)	0.04	100	–	–

^aTreatment with Fehling's solution furnished a pure glucan (Glc-100%).

^bYield calculated based on dried lichen.

^cAlditol acetates obtained after hydrolysis followed of reduction–acetylation and analysed by GC-MS.

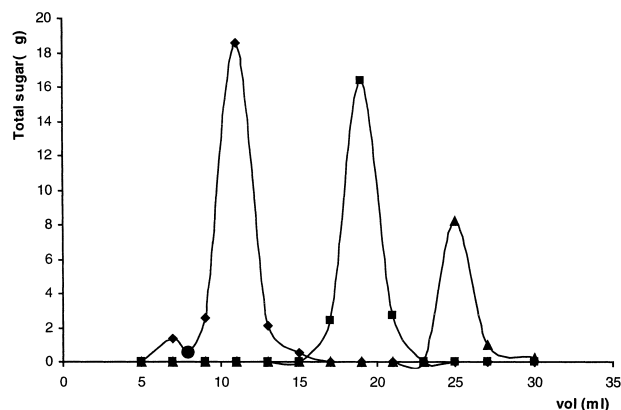


Fig. 1. GPC elution profiles of the isolated polysaccharides. (●) Void volume; (◆) pseudonigeran; (■) xylan; (▲) mannan. Column of Sepharose CL-6B (32 cm × 1.0 i.d.). Total sugar (μg) measured by the phenol-H₂SO₄ method.

itation with Fehling's solution, leaving the glucan in the supernatant (0.76% yield). When subjected to permeation chromatography on Sepharose CL-6B, it gave one peak with MW ~ 700 kDa. Methylation-GC-MS analysis gave rise to partially *O*-methylated alditol acetates corresponding to 3-*O*-substitution (99.9%) and traces of non-reducing end units of glucopyranose, showing a linear structure (Table 2). Its ¹H-NMR spectrum indicated that the (1 → 3)-linked glucan had an α-configuration, by virtue of a low-field H-1 signal at δ 5.20, agreeing with a typical high-field C-1 signal in its ¹³C-NMR spectrum at δ 100.9. Its ¹³C spectrum contained six signals, as expected for a hexose homopolysaccharide (Table 3) and these were assigned by COSY, TOCSY, HMQC and DEPT examination. HMQC analysis showed seven correlated signals (¹H/¹³C), the presence of a signal in the low-field region at δ 83.7/3.77 confirming 3-*O*-substitution and for unsubstituted C-6, a doublet at δ 61.2/3.87, 3.77 was present. This was confirmed by an inverted CH₂ signal at δ 61.2, on DEPT analysis.

Fraction PptF/T-10% was obtained as a precipitate from the residue of the 2% KOH extraction, by successive extraction with 10% KOH at 100°C, neutralisation, and freeze-thawing. The polysaccharide mixture contained glucose (58%), xylose (38%), and mannose (4%) (Table 1) and

treatment with hot DMSO dissolved the xylan (64%) and mannan (30%) components containing traces of insoluble glucan (6.0%) which was cleaned up with Fehling treatment. Such treatment gave soluble (Cu²⁺-Sup; yield 0.04%) and insoluble fractions (Cu²⁺-Ppt; yield 0.56%). The latter contained mannosyl and xylosyl units (Table 1) and when subjected to gel permeation chromatography (GPC) analysis, gave two peaks at MW ~ 60 kDa (mannan) and MW ~ 180 kDa (xylan). This fraction was subjected to permeation chromatography affording polymer separation. Methylation analysis showed the presence of non-reducing ends (0.1%) and 4-*O*-substituted (99.9%) Xylp units, confirmed by the presence of the peaks at *m/z* 118, 130 and 162 after reduction (NaBD₄)/acetylation (Table 2). The peak ratio showed a degree of polymerisation of ~162 kDa, agreeing with the GPC data. The xylan structure was confirmed by the ¹H- and ¹³C-NMR experiments, showing the presence of five ¹³C signals, consistent with a linear pentose homopolymer (Table 3). The anomeric region showed one low-field signal at δ 102.6, which suggests Xylp units having a β-glycosidic configuration and that at δ 76.4 corresponds to *O*-substituted C-4 [12]. The DEPT NMR spectrum of the xylan contained an inverted CH₂ signal at δ 64.1, arising from unsubstituted C-5, which confirmed the homopolymer structure.

Methylation analysis from the mannan showed the presence of non-reducing ends (0.3%) and 6-*O*-substituted (99.7%) Manp units (Table 2), indicating a degree of polymerisation of ~58 kDa, thus agreeing with the GPC results. The ¹³C-NMR spectrum of the mannan contained six signals, expected for a linear hexose polysaccharide (Table 3). A β-glycosidic configuration was shown by a high-field H-1 signal at δ 4.23 when analysed in DMSO-d₆ [13], present in its HMQC spectrum. The C-6 signal at δ 66.6 shows 6-*O*-substitution of Manp units, confirmed by a corresponding inverted CH₂ signal in the DEPT spectrum (also a doublet at δ 66.6 (3.4 and 3.06) in the HMQC spectrum). A 6-*O*-substituted β-Manp polymer is thus indicated.

The above three linear polysaccharides have not been observed in lichenised fungi to date. The linear (1 → 3)-linked α-D-glucan, called pseudonigeran, has been described as occurring in many fungi such as *Aspergillus*

Table 2
Analysis of *O*-methylated alditol acetates obtained via methylation analysis of polysaccharides obtained from *D. glabratum*

<i>O</i> -Me-alditol acetates ^a	<i>t</i> _M ^a	Polysaccharides (% values)			Linkage type
		Glucan	Xylan	Mannan	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1.10	tr. ^b	–	–	Glc _p -(1 →
2,3,4,6-Me ₄ -Man	1.00	–	–	0.3	Man _p -(1 →
2,3,4-Me ₃ -Xyl	0.82	–	0.1	–	Xyl _p -(1 →
2,4,6-Me ₃ -Glu	1.90	99.9	–	–	→ 3)-Glc _p -(1 →
2,3,4-Me ₃ -Man	1.76	–	–	99.7	→ 6)-Man _p -(1 →
2,3-Me ₂ -Xyl	1.19	–	99.9	–	→ 4)-Xyl _p -(1 →

^aRetention time (*t*_M) relative to 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glucitol.

^btr., trace amount.

Table 3

¹H- and ¹³C-NMR spectroscopic data of the purified polysaccharides, δ values expressed in ppm

Proton	Glucan →3)- α -GlcP-(1→ δ H/C		Xylan →4)- β -XylP-(1→ δ H/C		Mannan →6)- β -ManP-(1→ δ H/C	
H-1	5.20	100.9	4.27	102.6	4.29	104.8
H-2	3.87	71.3	3.15	72.8	3.07	72.9
H-3	3.87	83.8	3.28	74.1	3.32	73.8
H-4	3.39	70.8	3.54	75.7	3.17	77.6
H-5 ^a	3.51	73.1	3.17	64.1	3.18	77.6
H-5 ^b	—	—	3.87	—	—	—
H-6 ^a	3.57	61.2	—	—	3.07	66.6
H-6 ^b	3.87	—	—	—	3.74	—

^{a,b}Chemical shifts of protons linked directly to the carbon nucleus.

niger, *A. nidulans*, *Tremella mesenterica*, *Schizophyllum commune* and others such as *Paracoccidioides brasiliensis*. It appears to be involved as a reserve substance for growth cleistothecia as observed for the deuteromycetous *A. nidulans* and for yeasts of the genus *Schizosaccharomyces* [1].

The linear (1→4)-linked β -D-xylan occurs in higher plants and some algae [14], as well as in the cultured photobionts from *Ramalina celastri* [15]. However, this polymer has never been detected in intact lichens, possibly because of the small proportion (1–10%) of photobiont present in lichenised fungi [14]. Thus, the cyanobacterium *Scytonema* sp. of *D. glabratum* [16] is likely to produce the β -D-xylan.

Probably the most interesting polysaccharide of *D. glabratum* is the linear (1→6)-linked β -D-mannan, observed for the first time in nature. Whether it arises from the photo- or mycobiont is still in doubt. Linear mannans with β -glycosidic linkages occur in plants as (1→4)-linked polymers [17] and with alternate (1→3)- and (1→4)-linkages, in yeasts of *Rhodotorula* spp. [18], the protozoan *Crithidia deani* [19] and other lower trypanosomatids. Most fungal mannans are branched with α -linkages, although some of them contain mixed α - and β -linkages [13].

Acknowledgements

The authors would like to thank the Brazilian agencies, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX-CARBOIDRATOS and PADCT II/SBIO for financial assistance.

References

[1] Gorin, P.A.J. and Barreto-Bergter, E.M. (1983) In: The Polysacchar-

ides (Aspinall, G.O., Ed.), Vol. 2, pp. 365–409. Academic Press, New York.

- [2] Gorin, P.A.J., Baron, M. and Iacomini, M. (1988) Storage products of lichens. In: CRC Handbook of Lichenology (Galun, M., Ed.), Vol. III, pp. 9–23. CRC Press, Boca Raton, FL.
- [3] Woranovicz-Barreira, S.M., Gorin, P.A.J., Sasaki, G.L., Tischer, C.A., Ahti, T. and Iacomini, M. (1999) Chemotyping studies on the glucans of lichens of the genus *Cladonia*. *Phytochemistry* 52, 1069–1074.
- [4] Carbonero, E.R., Sasaki, G.L., Stuelp, P., Gorin, P.A.J., Woranovicz-Barreira, S.M. and Iacomini, M. (2001) Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* 194, 65–69.
- [5] Hawksworth, D.L. and Hill, D.J. (1988) A new name for *Dictyonema pavonium* (Swartz) Parmasto. *Lichenologist* 20, 101–101.
- [6] Zanin, S.M.W., Fontana, J.D., Hogge, L., Gorin, P.A.J. and Iacomini, M. (1987) Isolation and characterization of β -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the basidiomycetous lichen *Cora pavonia*. *Carbohydr. Res.* 168, 55–65.
- [7] Gorin, P.A.J. and Spencer, J.F.T. (1970) Proton magnetic resonance spectroscopy: an aid in identification and classification of yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.* 13, 25–89.
- [8] Trevelyan, W.E., Procter, D.P. and Harrison, J.S. (1950) Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* 166, 444–445.
- [9] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- [10] Whiton, R.S., Lau, P., Morgan, S.L., Gilbert, J. and Fox, A. (1985) Modifications in the alditol acetate method for analysis of muramic acid and other neutral and amino sugars by capillary gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. *J. Chromatogr.* 347, 109–120.
- [11] Ciucanu, I. and Kerek, F. (1984) Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 131, 209–217.
- [12] Gorin, P.A.J. (1973) Rationalization of carbon-13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. *Can. J. Chem.* 51, 2375–2383.
- [13] Gorin, P.A.J., Spencer, J.F.T. and Bhattacharjee, S.S. (1969) Structures of yeast mannans containing both α and β -linked mannopyranose units. *Can. J. Chem.* 47, 1499–1505.
- [14] Ahmadjian, V. (1993) *The Lichen Symbiosis*. John Wiley and Sons, New York.
- [15] Cordeiro, L.M.C., Ferreira, J.C., Gorin, P.A.J. and Iacomini, M. (2000) Carbohydrate polymer production by the algae chlorophyta isolated from *Ramalina celastri*. *Anais SBBq (Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology)*, Caxambu, M.G., p. 140.
- [16] Sasaki, G.L., Elifio, S.L., Cruz, L.M., Gorin, P.A.J. and Iacomini, M. (2001) Preliminary studies on the isolated photobiont (*Scytonema* sp.) from *Dictyonema glabratum*: Lipid and carbohydrate contents. *Anais SBBq (Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology)*, Caxambu, M.G., p. 140.
- [17] Stephen, A.M. (1983) Other plant polysaccharides. In: *The Polysaccharides* (Aspinall, G.O., Ed.), Vol. 2, pp. 98–180. Academic Press, New York.
- [18] Gorin, P.A.J., Horitsu, K. and Spencer, J.F.T. (1965) An exocellular mannan alternately linked 1,3- β and 1,4- β from *Rhodotorula glutinis*. *Can. J. Chem.* 43, 950–954.
- [19] Previato, J.O., Mendonça-Previato, L. and Gorin, P.A.J. (1979) A novel β -D-(1→2)-linked mannopyranan from *Crithidia deani*. *Carbohydr. Res.* 70, 172–174.

Structural characterization of a galactomannan from the cyanolichen *Leptogium azureum*

E.R. Carbonero^a, C.A. Tischer^a, C. Cosentino^b, P.A.J. Gorin^a, M. Iacomini^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, C.P.19046, CEP 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

^bIstituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche “G. Ronzoni”, Via Colombo n. 81, 20133 Milano, Italy

Received 11 November 2002; revised 2 May 2003; accepted 6 May 2003

Abstract

A galactomannan was isolated from the cyanolichen *Leptogium azureum* via successive alkaline extraction and precipitation with Fehling solution. The structure of the polysaccharide was investigated using NMR spectroscopy, methylation analysis, Smith degradation, and HPSEC-MALLS. As galactomannans from other lichens species, the polymer obtained presents a (1 → 6)-linked main chain of α -mannopyranose, substituted preferentially at O-2 by α -Manp or β -Galp non-reducing ends. As observed in previous investigations, the C-1 region of the ¹³C-NMR of these heteropolysaccharides are typical of some lichens species, and can be used as fingerprints in chemotaxonomy. However, in despite of the general structure in common, the substitution level of this structure and their content of mannose is higher than of the others galactomannans obtained of lichenized fungi contained the green alga of the genus *Trebouxia*.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Leptogium azureum*; Cyanolichen; Galactomannan

1. Introduction

Unlike the majority part of lichenized fungi, the ‘jelly lichens’ contain the alga as the dominant partner of symbiosis. Few studies on structural characterization of the polysaccharides have been carried out on cyanolichens, such as *Collema* spp. and *Leptogium* spp. These organisms grow in the proximity to wet habitats, and can contain cyanobacteria from the genus *Nostoc* (formerly called blue-green algae) as their photobionts (Purvis, 2000). Polymeric carbohydrates containing heteropolysaccharides based on mannose and glucans are among the most common polysaccharides of lichenized fungi (Gorin, Baron, da Silva, Teixeira, & Iacomini, 1993). The structural diversity of the galactomannans from several lichenized fungi depend on their side-chain substituents on (1 → 6)-linked α -D-mannopyranosyl main-chains (Gorin & Iacomini, 1985). These include, generally, monosubstituents at O-2 of α -D-Manp or α -D-Galp, at O-4 by β -Galp and sometimes with disubstitution occurring at O-2 and O-4 by α -D-Galp

and β -D-Galp, or α -D-Manp and β -D-Galp, respectively, although some of the main chains of units are frequently not substituted. Galactomannans have been isolated from several lichens, namely *Cladonia* spp. (Iacomini, Schneider, & Gorin, 1985; Woranovicz, Gorin, Marcelli, Torri, & Iacomini, 1997), *Newropogon aurantiaco-ater* (Baron, Iacomini, Fanta, & Gorin, 1991), *Collema leptosporum* (Prado, Gorin, Stuelp, Honda, & Iacomini, 1999), *Ramalina usnea* (Gorin & Iacomini, 1984), etc. We now characterize a highly substituted galactomannan, occurring in the lichenized fungus *Leptogium azureum*.

2. Experimental

2.1. Biological material

The lichenized fungus *L. azureum* (Collemataceae family) was collected in 2001, in the Serra da Graciosa, State of Paraná, Brazil. It was identified by Prof. Dra. Sionara Eliasaro (Department of Botanic of the Federal University of Paraná—UFPR) and has its voucher deposited in the Herbarium of the UFPR.

* Corresponding author. Tel.: +55-41-366-3372/361-1655; fax: +55-41-266-2042.

E-mail address: iacomini@bio.ufpr.br (M. Iacomini).

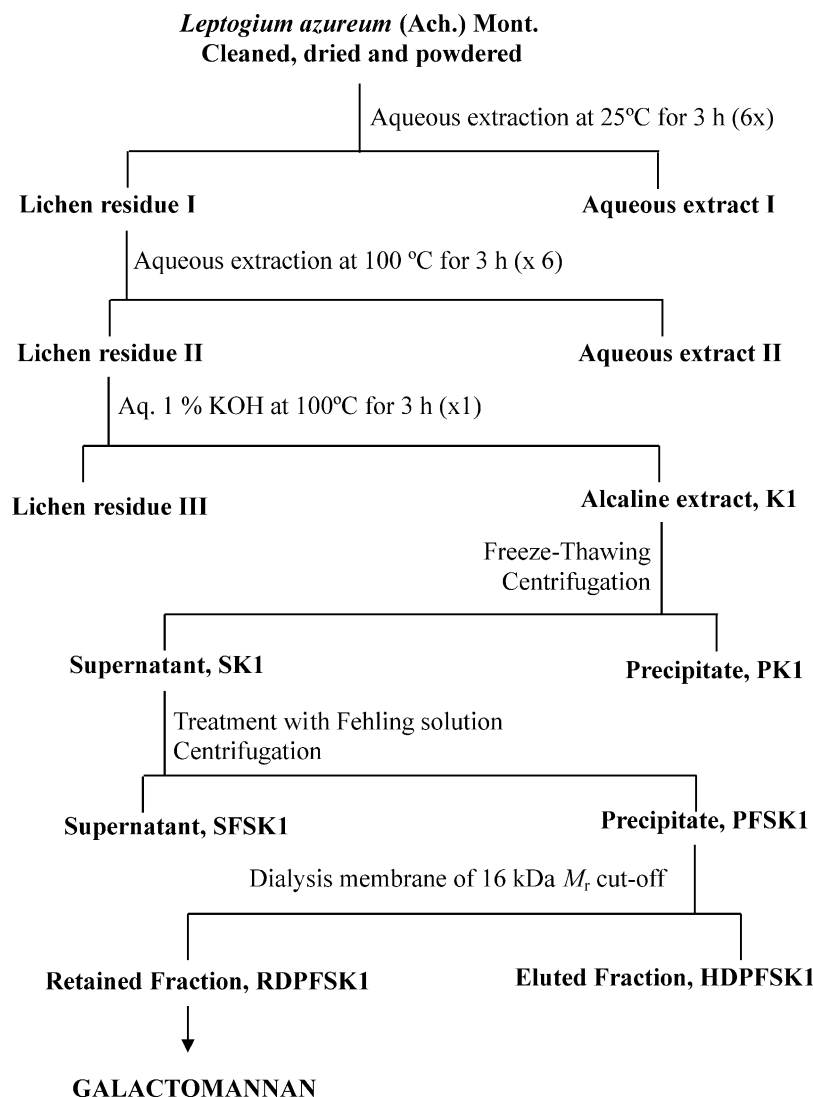
2.2. Isolation and purification of polysaccharides

Powdered thalli (100 g) were homogenized and extracted in a blender with 2 l of distilled water for 3 h at room temperature and then at 100 °C for 3 h (Scheme 1). Residual material was then extracted with 1% aq. KOH (600 ml) containing traces of NaBH₄ at 100 °C for 3 h. The alkaline extract was neutralized with HOAc, dialyzed against tap water, and after 48 h was lyophilized. The crude fraction obtained from alkaline extraction was submitted to a freeze thaw process, which furnished an insoluble (PK1) and a soluble material (SK1), which were separated by centrifugation (15 min, 9000 rpm, 25 °C). The SK1 fraction was submitted to a second purification process using Fehling solution (100 ml) (Jones & Stoodley, 1965), resulting in a precipitate (Cu²⁺ complex; PFSK1) and a soluble fraction (SFSK1) which were separated by centrifugation using the same conditions as above. Each fraction was neutralized with HOAc, dialyzed against tap water and deionized with mixed ion exchange resins. The PFSK1 fraction was

analyzed by HPSEC and proved to be heterogeneous (Fig. 1). For further purification PFSK1 was submitted to dialysis through a membrane with 16 kDa M_r cut-off, which resulted into an eluted (HDPFSK1) and a retained fraction (RDPFSK1), and the latest was analyzed by HPSEC (Fig. 1), presenting now a homogeneous behavior.

2.3. Monosaccharide composition

Hydrolysis of PFSK1 and RDPFSK1 were carried out with 1 M TFA at 100 °C for 8 h and the hydrolyzates then evaporated to dryness, followed by successive reduction with NaBH₄ and acetylation with Ac₂O-pyridine (1:1, v/v; 2 ml) at room temperature for 12 h (Wolf from & Thompson, 1963a,b). The resulting alditol acetates obtained were analyzed by GC–MS using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap, model 810 R-12 mass spectrometer, using a DB-225 capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.), with He as carrier gas. The analysis



Scheme 1. Extraction and purification of the galactomannan from *Leptogium azureum*.

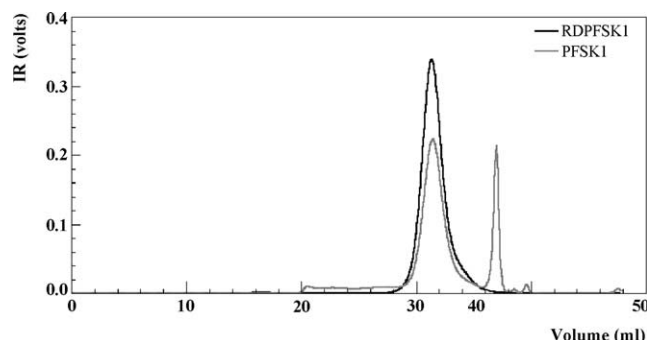


Fig. 1. Elution profiles of the fractions (PFSK1 and RDPFSK1) determined by HPSEC.

was carried out from 50–220 °C at 40 °C/min maintaining the temperature constant to the end of analysis (18 min).

2.4. Methylation analysis

Fraction RDPFSK1 (5 mg) was per-O-methylated according to the method of Ciucanu and Kerek (1984), using powdered NaOH in Me₂SO-MeI. The per-O-methylated derivatives were treated with refluxing 3% HCl–MeOH for 2 h at 80 °C, then 0.5 M H₂SO₄ at 100 °C for 14 h. The resulting mixtures of O-methylaldoses were reduced with NaBH₄ and acetylated as cited above to give a mixture of partially O-methylated alditol acetates, which was analyzed by GC–MS. The analysis was carried out from 50–215 °C at 40 °C/min maintained the temperature constant until to the end analysis (31 min), and the resulting partially O-methylated alditol acetates identified by their typical electron impact breakdown profiles and retention times (Jansson, Kenne, Liedgren, Lindberg, & Lönngrén, 1976).

2.5. Periodate oxidation

Fraction RDPFSK1 (20 mg) was oxidized to polyaldehydes with aqueous 0.05 M NaIO₄ (20 ml) for 72 h at room temperature in the dark (Abdel-Akher, Hamilton, Montgomery, & Smith, 1952; Hay, Lewis & Smith, 1965). Excess of oxidant was then eliminated by addition of ethylene glycol (1.0 ml), and the solution was dialyzed against tap water for 24 h. The solution was treated with NaBH₄ for 10 h at 25 °C, and excess reducing agent was destroyed by Dowex 50 × 8 (H⁺ form) ion exchange resin, and the solution dialyzed and then freeze-dried. The product was successively hydrolyzed, reduced with NaBH₄, acetylated, and the resulting polyol mixture analyzed by GC–MS (conditions as in item 2.3).

2.6. Determination of homogeneity and molar mass

The elution profiles of fractions (PFSK1 and RDPFSK1) were determined by high performance size-exclusion chromatography (HPSEC), using a WATERS 510 HPLC

pump at 0.6 ml/min with four gel permeation columns in series with exclusion sizes of 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , and 5×10^3 Da, using a refraction index (RI) detector. The eluent was 0.1 mol/l aq. NaNO₃ containing 200 ppm aq. NaN₃. Samples, previously filtered through a membrane (0.22 μm; Millipore), were injected (250 μl loop) at 2 mg/ml.

The specific refractive index increment (dn/dc) was determined for fraction RDPFSK1. The sample was dissolved in 50 mM NaNO₃ and five increasing concentrations, ranging from 0.25 to 0.7 mg/ml, were used to determine the slope of the increment. Results were processed in software provided by the manufacturer (Wyatt Technologies).

2.7. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained using a 400 MHz Bruker model DRX Avance spectrometer with a 5 mm inverse probe. ¹³C-NMR (100.6 MHz) and ¹H-NMR (400.13 MHz) analyses were performed at 50 or 30 °C, with the samples being dissolved in D₂O. The OH groups were exchanged with D₂O followed by freeze-drying. Chemical shifts of samples are expressed in ppm (δ) relative to acetone at δ 30.20 and 2.22 for ¹³C and ¹H signals, respectively.

The ¹³C NMR coupled pulse of 90° was performed with delay time of 0.1 s and acquisition time of 0.6 s for decoupled spectra. For coupled spectra methyl α-D-mannopyranoside had a coupling constant $J_{C1,H1}$ of 172.0 Hz, and methyl β-D-galactopyranoside 160.0 Hz.

COSY, HMQC, ROESY, and DEPT spectra were obtained according to the Bruker manual.

3. Results and discussion

The precipitate obtained using Fehling solution (fraction PFSK1; 2.8% yield), contained xylose, mannose, galactose, and glucose in a molar ratio of 1:11:3:2. HPSEC analysis showed heterogeneity with two main peaks (Fig. 1). This fraction was dialyzed against distilled water (membranes of 16 kDa M_r cut-off) giving two pure fractions (RDPFSK1, 2.3% yield; and HDPFSK1, 0.4% yield). The former homogeneous fraction when analyzed by HPSEC (Fig. 1), had a M_r 4.6×10^5 kDa ($dn/dc = 0.150$). This fraction contained mannose and galactose in a molar ratio of 5:1. Methylation analysis (Table 1) showed a highly branched polysaccharide, containing non-reducing end-units of Manp (29.0%) and Galp (17.2%), besides the 2,6 di-O-substituted (32.6%) and 2,4,6 tri-O-substituted units (4.5%). Periodate oxidation showed high content of glycerol (87%) obtained from this sample arose from the non-reducing end of Manp and Galp, as well as 2-O-, 6-O- and 2,6 di-O-substituted units. The production of erythritol (8%) was due to 4-O-substituted units, and the mannitol acetate (5.0%) was

Table 1

Analysis of partially O-methylated alditol acetates obtained from methylated galactomannan

O-Me-alditol acetates	Molar %	Linkage type ^a
2,3,4,6-Me ₄ -Man	29.0	Manp-(1 →
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	17.2	Galp-(1 →
3,4,6-Me ₃ -Man	3.3	2 →)-Manp-(1 →
2,3,6-Me ₃ -Man	6.0	4 →)-Manp-(1 →
2,3,4-Me ₃ -Man	7.4	6 →)-Manp-(1 →
3,4-Me ₂ -Man	32.6	2,6 →)-Manp-(1 →
3-Me-Man	4.5	2,4,6 →)-Manp-(1 →

^a Based on derived O-methylalditol acetates.

consistent with the presence of 2,4,6 tri-O-substituted Manp units. The methylation and periodate oxidation data are in agreement in determining the structure of this heteropolysaccharide.

The ¹³C-NMR spectrum of the galactomannan (RDPFSK1; Fig. 2) contained signals in the C-1 region at δ (104.7, 103.5, 100.5, and 99.6, which correspond to non-reducing-end groups of β -D-Galp, of α -D-Manp-(1 → 2)- α -Manp, 6-O- and 2,6-di-O-substituted units of α -D-Manp from the core, respectively (Gorin & Iacomini, 1985; Prado et al., 1999). The α and β configurations were determined by ¹H resonance characteristics in a ¹H (obs.), ¹³C HMQC spectrum (Fig. 3). A coupled ¹³C-NMR was prepared to determine glycosidic configurations (Perlin & Casu, 1969). The non-reducing end of Galp has a β -configuration by virtue of a high-field H-1 signal in δ 4.42 (104.7), which is in agreement with the $J_{C-1,H-1}$ value of 158.9 Hz. The low-field H-1 signals in δ 5.07 (103.5 and 103.2; $J_{C-1,H-1}$ = 170.5), 5.16 (100.5) and 5.11 (99.6; $J_{C-1,H-1}$ = 174.4 Hz) indicated that the units of Manp had an α -configuration, agreeing with a typical high-field C-1 signals in its ¹³C-NMR spectrum and the $J_{C-1,H-1}$ values obtained.

Its ¹H (obs.), ¹³C HMQC (Fig. 3), COSY and DEPT analysis of the fraction RDPFSK1 gave information about the linkages. The inverted signal in the DEPT spectrum that appear as a doublet in the HMQC spectrum at δ 67.0 with H-6 at 4.02 and H6' at 3.70 suggest a substituted CH₂ group and probably of C-6 of α -Manp units concerning

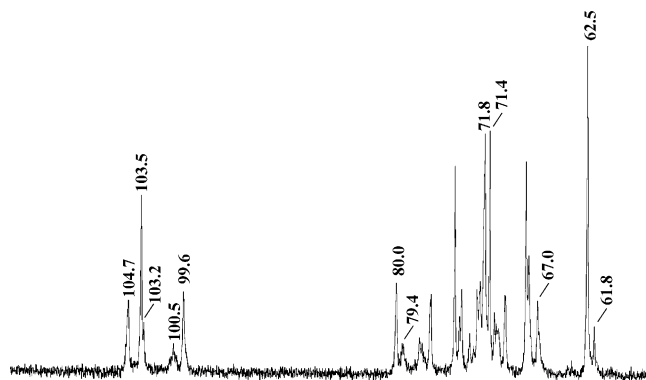


Fig. 2. ¹³C NMR spectrum of the galactomannan in D₂O at 50 °C (chemical shifts are expressed as ppm).

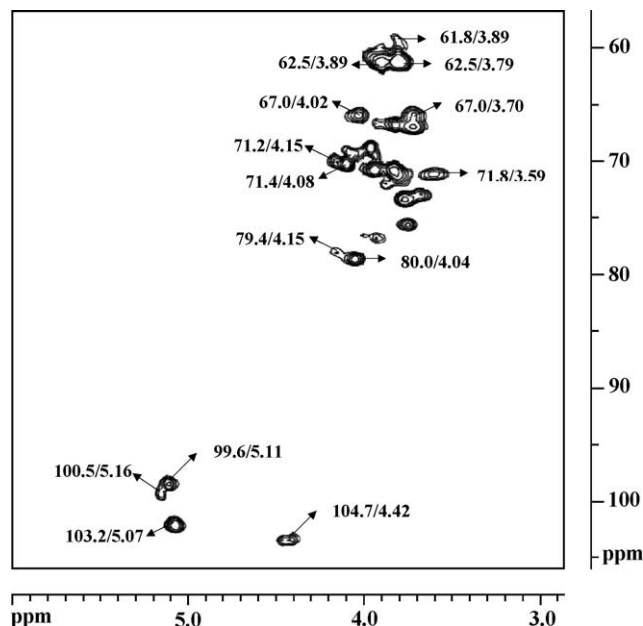


Fig. 3. ¹H, ¹³C HMQC spectrum of the galactomannan in D₂O at 50 °C (chemical shifts are expressed as ppm).

the methylation analysis (3,4-O-Me₂-Man, 32.6%). The non substituted C-6's appear as, a doublet at 62.5 (3.89; 3.79) and, the signal 61.8/3.89 from the non reducing ends of the α -Manp and β -Galp units; these were confirmed by inverted CH₂ signals at 62.5 and 61.8 in the DEPT spectrum. COSY examination showed coupling of the five anomeric protons with their respective H-2 resonances. Only the H-2 signal at δ 3.59 (C-2, δ 71.8) is coupled with δ 4.42 signal, the H-1 of the β -Galp unit, that is typical to those obtained by Gorin to the Me-Galactosides (Gorin & Mazurek, 1975). Similarly, H-1 of the non-reducing end group of α -Manp units at δ 5.07 was coupled to H-2 at δ 4.08 (C-2, δ 71.4), was observed with the well-resolved signals of the HMQC and COSY spectra. The same to the couplings between the δ 5.11 to H-2 at δ 4.04 (C-2, δ 80.0) arising from Manp non reducing end 2-O-substituted Manp units of the (1 → 6)-linked main-chain. A small signal at δ 79.4 (4.15) can be attributed to the Manp units C-2 substituted by non reducing end units of β -Galp concerning the intensity and the coupled H-1 proton that appear in COSY at δ 5.06. As confirmation, H-1 signal of the non reducing end Galp at δ 4.42 showed ROESY correlation with the H-2 signal of the 2-O-substituted Manp units of the (1 → 6)-linked main-chain (δ 4.15). The methylation analyses have showed ~7.4% of 2,3,4-O-Me-Manp suggesting small amounts of the Manp that was not C-2 substituted, in agreement of these, we found the correspondent H-1 at δ 5.16 coupled with δ 4.15 (δ 71.2) (Gorin & Mazurek, 1975).

So, we conclude that the galactomannan (fraction RDPFSK1) presents a main chain of (1 → 6)-linked α -D-mannopyranosyl residues, almost all which preferentially branched at O-2 with side chains of different lengths. However, galactomannan with high substitution level and

elevated content of mannose was encountered only in the cyanolichen *Collema leptosporum* (Prado et al., 1999), suggesting that similar structures can be typical of lichenized fungi from the Collemataceae family.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dra. Sionara Eliasaro for identification of the lichenized fungus and the Brazilian agencies, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX-CARBOIDRATOS and PADCT II/SBIO for financial assistance.

References

- Abdel-Akher, M., Hamilton, J. K., Montgomery, R., & Smith, F. (1952). A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. *Journal of American Chemical Society*, 74, 4970–4971.
- Baron, M., Iacomini, M., Fanta, E. S., & Gorin, P. A. J. (1991). Galactomannan, lichenan and isolichenan from the polysaccharide-rich lichen *Newropogon aurantiaco-ater*. *Phytochemistry*, 30(9), 3125–3126.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209–217.
- Gorin, P. A. J., Baron, M., da Silva, M. L. C., Teixeira, A. Z. A., & Iacomini, M. (1993). Lichen carbohydrates. *Ciência e Cultura (Brazil)*, 45, 27–36.
- Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (1984). Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. *Carbohydrate Research*, 128, 119–132.
- Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (1985). Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. *Carbohydrate Research*, 142, 253–267.
- Gorin, P. A. J., & Mazurek, M. (1975). Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Canadian Journal of Chemistry*, 53(8), 1212–1223.
- Hay, G. W., Lewis, B. A., & Smith, F. (1965). Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 357–360.
- Iacomini, M., Schneider, C. L., & Gorin, P. A. J. (1985). Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer moss), *Cladonia confusa*, and *Cladonia amaurocraea*. *Carbohydrate Research*, 142, 237–251.
- Jansson, P., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B., & Lönnngren, J. (1976). A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Journal of Chemistry Society, Chemistry Communications*, 48, 1–70.
- Jones, J. K. N., & Stoodley, R. J. (1965). Fractionation using copper complexes. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 36–38.
- Perlin, A. S., & Casu, B. (1969). Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose- ^{13}C . *Tetrahedron Letters*, 34, 2919–2924.
- Prado, S. R. T., Gorin, P. A. J., Stuelp, P. M., Honda, N. K., & Iacomini, M. (1999). An unusual juxtaposition of polysaccharides components of *Collema leptosporum*. *Carbohydrate Polymers*, 40, 271–276.
- Purvis, W. (2000). *Lichens*. Singapore: Craft Print, 122p.
- Wolfson, M. L., & Thompson, A. (1963a). Reduction with sodium borohydride. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2, 65–67.
- Wolfson, M. L., & Thompson, A. (1963b). A acetylation. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2, 211–215.
- Woranicz, S. M., Gorin, P. A. J., Marcelli, M., Torri, G., & Iacomini, M. (1997). Structural studies on the galactomannans of lichens of the genus *Cladonia*. *The Lichenologist*, 29, 471–481.

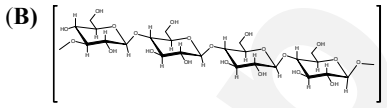
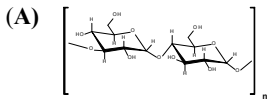
Glucans of lichenized fungi: their significance in chemotyping the genera *Parmotrema* and *Rimelia*

Elaine R. Carbonero ^a, Anderson V. Montai ^a, Caroline G. Mellinger ^a,
Sionara Eliasaro ^b, Guilherme L. Sassaki ^a, Philip A. J. Gorin ^a, Marcello Iacomini^a

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, C.P.19046, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brasil

^b Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, C.P.19031, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brasil

Nigeran (A) and lichenan-type (B) glucans of species of *Parmotrema* and *Rimelia* were characterized, serving to show a common chemotaxonomy of the distinguished split *Parmotrema* and *Rimelia* genera, and that could be reconsidered.



Glucans of lichenized fungi: their significance in chemotyping the genera

Parmotrema and *Rimelia*

Elaine R. Carbonero^a, Anderson V. Montai^a, Caroline G. Mellinger^a, Sionara Eliasaro^b, Guilherme L. Sassaki^a, Philip A. J. Gorin^a, Marcello Iacomini^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, C.P.19046, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brasil

^b Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, C.P.19031, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brasil

*Corresponding author. Tel.: +55-41-361-1655; Fax: +55-41-266-2042.

E-mail address: iacomini@ufpr.br (M. Iacomini)

Abstract

The glucans of lichenized fungi are an important class of polysaccharides as they have structural and chemotaxonomic roles. The water-insoluble glucans of the genus *Parmotrema* (*P. austrosinense*, *P. delicatulum*, *P. mantiqueirense*, *P. schindlerii*, and *P. tinctorum*) and those of *Rimelia* (*R. cetrata* and *R. reticulata*), were investigated in order to evaluate their significance in chemotyping. Nigerans [(1→3),(1→4)-α-glucan] and lichenans [(1→3),(1→4)-β-glucan] structures were characterized using ¹H- and ¹³C-NMR, methylation analysis, and controlled Smith degradations. Results from all species were similar, suggesting that these glucans serve to show a common chemotaxonomy of the distinguished split *Parmotrema* and *Rimelia* genera, and that could be reconsidered.

Keywords: *Parmotrema* spp.; *Rimelia* spp.; Parmeliaceae; chemical structure; polysaccharides; glucans.

1. Introduction

Lichenized fungi have been extensively investigated in terms of their carbohydrate components. Among the polysaccharides, two classes are present, one being heteropolysaccharides, including mannose-containing polysaccharides, and the other glucans (Gorin et al., 1988; Gorin et al., 1993; Olafsdottir and Ingólfssdottir, 2001).

In terms of chemical structure, the glucans of lichenized fungi are mostly linear and can be classified according to the following structural types, namely nigeran [α -D-(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4) in a ratio of \sim 1:1], lichenan [β -D-(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)], isolichenan [α -D-(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)], pullulan [α -D-(1 \rightarrow 4),(1 \rightarrow 6)], with varying ratios of glycosidic linkages, pustulan [β -D-(1 \rightarrow 6)], pseudonigeran [α -D-(1 \rightarrow 3)], laminaran [β -D-(1 \rightarrow 3)], and amylose [α -D-(1 \rightarrow 4) glucan]. Branched β -glucans containing (1 \rightarrow 3) and (1 \rightarrow 6) linkages can also be present (Gorin et al., 1988; Olafsdottir and Ingólfssdottir, 2001; Sasaki et al., 2002).

Lichenan- type glucan is suggested to be primarily a structural element of the fungal wall, with important functions in thallus water relations, rather than a storage compound of lichen-forming ascomycetes (Honegger and Haish, 2001). The glucans of lichens have also shown to have interesting biological properties and in a review covering the previous 30 years, Olafsdottir and Ingólfssdottir (2001) showed that lichen polysaccharides, including structurally different glucans, can have antitumoral, antiviral, and immunological activities, parallel to a low level of toxicity. Glucans are also useful in terms of lichenized fungi taxonomy, based on their wide distribution throughout the lichens and the diversity of their chemical structure (Sasaki et al., 2002; Woranowicz-Barreira et al., 1999; Carbonero et al., 2001; Carbonero et al., 2002).

Lichens of the Parmeliaceae have been examined by Common (1991) with a series of iodine tests giving positive blue colors due to the formation of the KI_3^+ complex and these were attributed to the presence of lichenan and isolichenan. However, Meyer and Gürtler (1947a) did not detect this coloration with the lichenan of *Cetraria islandica*, although they obtained a blue coloration with the mother liquor obtained from lichenan precipitation on cooling of a hot aqueous extract. Although, this was assigned to isolichenan, this was shown to be incorrect as a further investigation on *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea* showed this to be due to the presence of traces of amylose (Meyer and Gürtler, 1947b).

We now report the chemical characterization of water-insoluble glucans from several species of *Parmotrema* and *Rimelia* with a chemotaxonomic perspective in order to provide evidence for similarities or differences between the two genera.

2. Results

As shown in Scheme 1, lichenized fungi of *Parmotrema* and *Rimelia* spp. were extracted with $CHCl_3$ -MeOH and then MeOH- H_2O to remove low-molecular weight compounds. The residue was then extracted thrice with hot 2% aq. KOH, which was neutralized with HOAc, dialyzed against tap water for 2 days, and freeze-dried. Each extract was then resuspended in water, frozen, and then thawed gently, resulting in the formation of a precipitate (FTP) and soluble material. FTP was subjected to a similar alkaline treatment, dialyzed and treated with 4% aq. HOAc at 80°C for 30 min to give acid insoluble (IAA) and soluble fractions (SAA). IAA and SAA were treated again to further freeze-thawing. The precipitate from IAA, designated PIAA, is an α -glucan and that from SAA (PSAA) a β -glucan. All carbohydrate fractions, from FTP on, contained ~99% glucose as the main component (GC-MS of alditol acetates).

In a preliminary examination, ^{13}C -NMR spectra of all FTP fractions (Fig. 1) contained 5 signals in the anomeric region, three of them from a β -glucan (δ 103.5, 102.6, and 102.5) and two from the α -glucan (δ 100.4 and 99.6). Those of the α -glucan (Fig. 2), together with signals at δ 82.6 (*O*-substituted C-3) and 79.2 (*O*-substituted C-4) show it to be alternately (1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 4)-linked (Woranovicz-Barreira et al., 1999), indicating a minor nigeran-like structure.

As shown above and in Scheme 1, purified α -glucan (PIAA) and β -glucan fractions (PSAA) were obtained. Fig. 2 shows the α -glucan spectrum of *R. cetrata* representing all PIAA fractions once all lichens gave rise to indistinguishable ^{13}C spectra. Similar spectra were also observed for all of the PSAA fractions (Fig. 3). In this case, the anomeric signal at δ 103.6 arose from 3-*O*-substituted, and the predominant ones at δ 102.7, and 102.6 from 4-*O*-substituted β -Glc_p units. The β -configuration was confirmed by H-1 signals at high field of δ 4.38 and 4.28, from H-1 of 3-*O*-substituted and 4-*O*-substituted glucosyl units, respectively, as shown by their relative areas.

The ^{13}C signals of the β -glucan can be assigned with the aid of the spectra of laminaran and cellulose (Gorin, 1981). The signals at δ 80.1 and 80.0 are from C-4 of 4-*O*-substituted glucosyl units, while that at δ 60.4 arises from non-substituted CH_2 group of the same units. The signals at δ 87.0, 76.3, 68.4, and 60.8 correspond to C-3, C-5, C-4, and C-6 of 3-*O*-substituted units, respectively. The β configuration, together with the signals referring to substitutions at O-3 and O-4 denotes the presence of lichenans in all studied species.

As the spectra of β -glucans from all of the lichens were virtually identical, further analyses were carried out with that of *P. austrosinense*, as a representative species. An accurate ratio of glycosidic linkages was determined by comparing the peak areas of H-1 signals at δ 4.28 to 4.38. These were present in a 3.1:1 ratio for (1 \rightarrow 4)- and (1 \rightarrow 3)-

linkages respectively. This was identical to the linkage ration obtained on methylation analysis incorporating measurement of peak areas obtained by GC-MS of derived alditol acetates of 2,3,6- and 2,4,6-Me₃Glc.

A Smith degradation incorporating mild hydrolytic conditions (Abdel-Akher et al., 1952; Hay et al., 1965) was carried out to determine the sequence of linkages in this β -glucan. HPLC of the product gave only peaks corresponding to 2-*O*- β -D-glucopyranosyl-D-erythritol (9.6 min) and erythritol (13.1 min). The absence of glucobiosyl erythritol showed that most of the 3-*O*-substituted glucosyl residues are interspersed between the 4-*O*-substituted units, with no consecutive (1 \rightarrow 3)-linkages.

3. Discussion

Both *Parmotrema* and *Rimelia* genera contained both α - and β -glucans, corresponding to nigeran and lichenan respectively, lichenan being present in a very higher quantity of the nigeran.

The nigerans with a linkage ratio of 1:1 are well-known polysaccharides, widely found in lichen, which include species of *Cladonia* (Woranovicz-Barreira et al., 1999), *Cladina* (Carbonero et al., 2002), *Ramalina* (Stuelp et al., 1999; Cordeiro et al., 2003) among others. Woranovicz-Barreira et al. (1999) have suggested that nigerans could be used as chemotyping molecules in *Cladonia* spp. In the Parmeliaceae, they have been described in *Letharia vulpina* (Iacomini et al., 1988), and some species of *Parmelia* s. lat. (Shibata, 1973) among others.

Lichenans have also been characterized from several species of lichenized fungi, but different from the nigerans, there is a species variation in the ratio of (1 \rightarrow 3) to (1 \rightarrow 4) linkages. Although this ratio is constant between some species of Parmeliaceae, such as *Cetraria islandica* (3:7) (Meyer and Grtler, 1947a) *C. richardsonii* (3:7)

(Yokota et al., 1979), and *Usnea rubescens* (3:7) (Nishikawa et al., 1974), it differs with an *Usnea* sp. (1:3) (Iacomini et al., 1988). Species from the genus *Parmelia* s. lat. are also known to contain lichenans (Shibata, 1973), but the ratios are not cited in the literature yet.

Olafsdottir and Ingólfssdottir (2001) suggested that some polysaccharides from lichenized fungi present taxonomic importance at family level once they are widely distributed in three different lichen families: the pustulan are characteristic for Umbilicariaceae, the nigeran for Cladoniaceae, and the lichenan for Parmeliaceae. In Parmeliaceae, the genus *Parmotrema* is known to have *Cetraria*-type lichenan (3:7) in the cell wall, while the segregated genus *Rimelia* contains intermediate-type lichenan (Common, 1991; Elix, 1994). Another important difference, according to lichenologists, on polysaccharides from Parmeliaceae concerns the iodine reactions. The genus *Parmotrema* is known to color the lichen thalli when using iodine solutions, while the segregated genus *Rimelia* does not show the same response. These differences are considered to be due to a distinct glucan content.

Our findings showed species of *Parmotrema* and *Rimelia* (*P. austrosinense*, *P. delicatulum*, *P. schindlerii*, *P. mantiqueirens*, *P. tinctorum*, *R. cetrata* and *R. reticulata*) to contain similar nigerans and lichenans, even to the extent of their relative proportion. Lichenans presenting linkage ratio of 3.1:1 were found in all studied species after methylation analysis, confirmed by $^1\text{H-NMR}$ of *P. austrosinense*. *Rimelia cetrata* (= *Parmotrema cetratum*), presented a ratio of 2:1 when firstly analyzed (Corradi da Silva et al., 1993). The ratio difference, when compared to our data, could be due to contaminants in the sample, once the authors cited that the fractionation procedure was not fully successful.

One can finally conclude that the chemical characterization of glucans, should be an important aid in chemotaxonomy of lichens, and that our results together with DNA

analysis (Crespo and Cubero, 1998; Louwhoff and Crisp, 2000) should be considered to re-evaluate the segregation of the genus *Rimelia*.

4. Experimental

4.1. Lichenized fungi (Parmeliaceae)

Parmotrema austrosinense (Zahlbr.) Hale, *P. delicatulum* (Vain.) Hale, *P. schindlerii* Hale, *P. mantiqueirens* Hale, *P. tinctorum* (Nyl.) Hale, *Rimelia cetrata* (Ach.) Hale & Fletcher and *R. reticulata* (Taylor) Hale & Fletcher were examined. *Parmotrema* spp. were collected in 1996, in the town of Lapa, State of Paraná, Brazil, while *Rimelia* spp. are from the city of Curitiba, State of Paraná, and have their vouchers (no. 33886, 33354, 33890, 33355, 28838, 38057, 38118, respectively) deposited in the UPCB (Herbarium name follows that assigned by Holmgren et al., 1990).

4.2. Isolation and purification of polysaccharides

Lichenized fungus samples (*Parmotrema austrosinense*, 41 g; *P. delicatulum*, 32 g; *P. schindlerii*, 35 g; *P. mantiqueirens*, 43 g; *P. tinctorum*, 60 g; *Rimelia cetrata*, 31 g; and *R. reticulata*, 26 g) were successively refluxed in CHCl₃-MeOH (2:1 v/v; 300 ml) and 80% aqueous MeOH (300 ml), in order to extract low molecular components. The residual material was then extracted three times with 2% aq. KOH containing traces of NaBH₄ at 100°C for 3 h. The alkaline extract was neutralized with HOAc, dialyzed against tap water, and after 48 h was freeze dried. The crude fraction obtained from alkaline extraction was submitted to a freeze-thawing process, which furnished insoluble and soluble material, which were separated by centrifugation (15 min, 9000 rpm, 25°C). The insoluble fraction was submitted to a additional purification process,

which was extracted once more with 2% aq. KOH at 100°C for 2 h, dialysed against tap water to neutral pH (48 h) and treated with 4% aq. HOAc at 80°C for 30 min. After centrifugation, dialysis of soluble and insoluble fractions in HOAc was carried out against tap water for 2 days, when the last freeze-thawing step was performed. The final precipitate of each species consisted of purified glucans.

4.3. Monosaccharide composition

Hydrolysis of the fractions were carried out with 1 M TFA at 100°C for 8 h and the hydrolyzates then evaporated to dryness, followed by successive reduction with NaBH₄ and acetylation with Ac₂O-pyridine (1:1, v/v; 2 ml) at room temperature for 12 h (Wolfrom and Thompson, 1963a, 1963b). The resulting alditol acetates were analyzed by GC-MS using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap, model 810 R-12 mass spectrometer, using a DB-225 capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.), with helium as carrier gas. The analysis was carried out from 50-220°C at 40°C/min maintaining the temperature constant to the end of analysis (18 min).

4.4. Methylation analysis

The PSAA fraction from *P. austrosinense* (5 mg) was per-*O*-methylated according to the method of Ciucanu and Kerek (1984), using powdered NaOH in Me₂SO-MeI. The per-*O*-methylated derivatives were hydrolyzed with 50% v/v sulfuric acid (1 h, 0°C), followed by dilution to 5.5% v/v (18 h, 100°C), neutralization with BaCO₃ and filtration (Saeman et al., 1954). The resulting mixture of *O*-methylaldoses was reduced with NaBH₄ and acetylated as cited above to give a mixture of partially *O*-methylated alditol acetates, which was analyzed by GC-MS. The analysis was carried out from 50-215°C at 40°C/min maintained the temperature constant until to the end analysis (31 min), and

the resulting partially *O*-methylated alditol acetates identified by their typical electron impact breakdown profiles and retention times (Jansson et al., 1976).

4.5. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

NMR spectra were obtained using a 400 MHz Bruker model DRX Avance spectrometer with a 5 mm inverse probe. ^1H and ^{13}C -NMR were performed at 50°C or 30°C, with samples being dissolved in $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$. Chemical shifts of samples are expressed in ppm (δ) relative to $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ at δ 39.70 and 2.40 for ^{13}C and ^1H signals, respectively.

4.6. Controlled Smith degradation

The PSAA fraction from *P. austrosinense* (100 mg) was oxidized to polyaldehydes with aqueous 0.05 M NaIO_4 (50 ml) for 72 h at room temperature in the dark (Abdel-Akher et al., 1952; Hay et al., 1965). Excess of oxidant was then destroyed by addition of ethylene glycol (1.0 ml), and the solution was dialyzed against tap water for 48 h. The solution was treated with NaBH_4 for 18 h at 25°C, excess reducing agent was destroyed by Dowex 50 x 8 (H^+ form) ion exchange resin, and the solution was dialyzed for 48 h. The oxidized material was successively hydrolyzed (TFA pH 2, 100°C for 40 min), evaporated to dryness, and the residual analyzed by HPLC.

4.7. High performance liquid chromatography (HPLC)

The experiments were carried out using a Shimadzu HPLC chromatograph equipped with a refractive index detector (Shimadzu 10A) at 40°C. Samples were analyzed using an Aminex® ion exclusion (Bio Rad Inc.) column (HPX 87-H, 300 x 7.8 mm) after passing through a Micro-Guard (Bio Guard Inc.) cartridge filled with material

similar to that of the main column. The material was eluted with degassed solution of sulfuric acid (8 mmol) in deionized water at 65°C with a 0.6 ml.min⁻¹ flow rate. Samples (20 µl) were injected into the column using an injection manual valve. The samples were identified by their retention times compared with those of standards erythritol and 2-*O*-β-D-glucopyranosyl-D-erythritol.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Brazilian agencies, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação Araucária-PRONEX CARBOIDRATOS 2004/2006 for financial assistance.

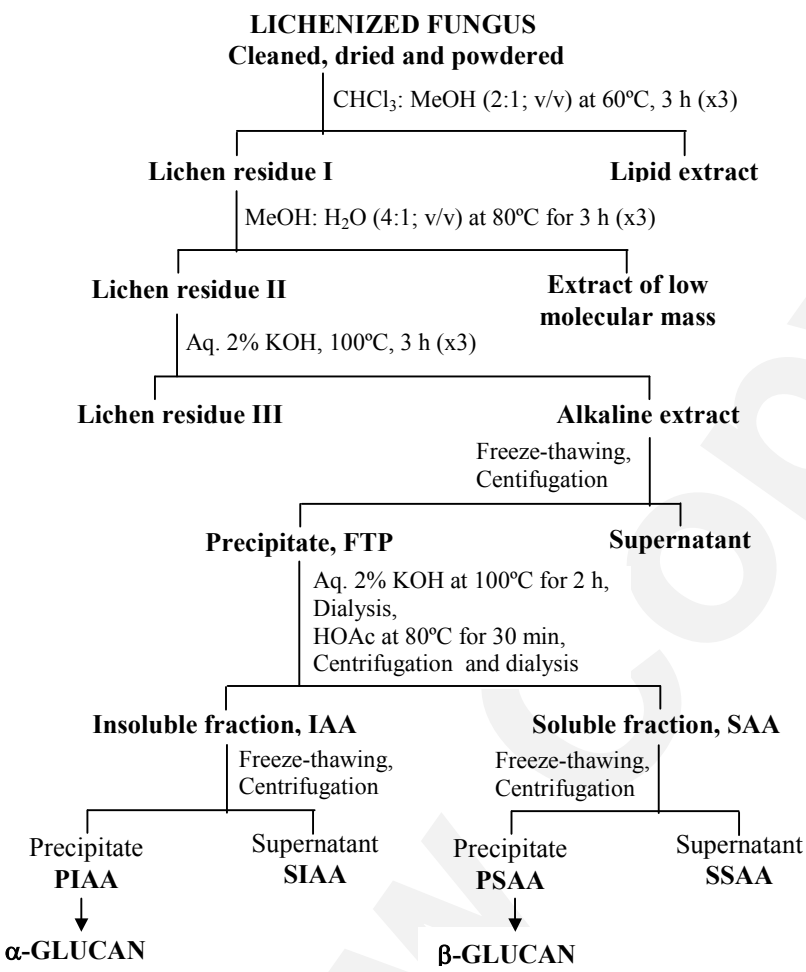
References

- Abdel-Akher, M., Hamilton, J. K., Montgomery, R., Smith, F., 1952. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. *J. Amer. Chem. Soc.* 74, 4970-4971.
- Carbonero, E. R., Sasaki, G. L., Stuelp-Campelo, P. M., Gorin, P. A. J., Woranovicz-Barreira, S. M., Iacomini, M., 2001. Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* 194, 65-69.
- Carbonero, E. R., Montai, A. V., Woranovicz-Barreira, S. M., Gorin, P. A. J., Iacomini, M., 2002. Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladina* spp.: significance as chemotypes. *Phytochemistry* 61, 681-686.
- Ciucanu, I., Kerek, F., 1984. Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 131, 209-217.

- Common, R. S., 1991. The distribution and taxonomic significance of lichenan and isolichenan in the Parmeliaceae (Lichenized Ascomycotina), as determined by iodine reactions. I. Introduction and methods. II. The genus *Alectoria* and associated taxa. *Mycotaxon* 41, 67-112.
- Cordeiro, L. M. C., Stocker-Wörgötter, E., Gorin, P. A. J., Iacomini, M., 2003. Comparative studies of the polysaccharides from species of the genus *Ramalina*-lichenized fungi-of three distinct habitats. *Phytochemistry* 63, 967 – 975.
- Corradi da Silva, M. L., Gorin, P.A. J., Iacomini, M., 1993. Unusual carbohydrates from the lichen, *Parmotrema cetratum*. *Phytochemistry* 34, 715-717.
- Crespo, A, Cubero, O. F., 1998. A molecular approach to the circumscription and evaluation of some genera segregated from *Parmelia* s. lat. *Lichenologist*, 30, 369-368.
- Elix, J. A., 1994. Parmeliaceae. *Flora of Australia*. 55, 140-186.
- Gorin, P. A. J., 1981. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 38, 13-104.
- Gorin, P. A. J., Iacomini, M., 1984. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. *Carbohydr. Res.* 128, 119-132.
- Gorin, P. A. J., Baron, M., Iacomini, M., 1988. Storage products of lichens. In: Galun, M (Ed.), *CRC Handbook of Lichenology*. CRC Press, Florida, pp. 9-23.
- Gorin, P. A. J., Baron, M, da Silva, M. L. C., Teixeira, A. Z.A., Iacomini, M., 1993. Lichen carbohydrates. *Ciência e Cultura (Brazil)* 45, 27-36.
- Hay, G. W., Lewis, B. A., Smith, F., 1965. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. *Meth. Carbohydr. Chem.* 5, 357-360.
- Holmgren, P. K., Holmgren, N. H., Barnett, L. C., 1990. *Index Herbariorum*. 8 th ed. Part I: The herbaria of the world. *Regnum Veg.* 120, 1-693.

- Honegger, R., Haish, A., 2001. Immunocytochemical location of the (1→3) (1→4)- β -glucan lichenin in the lichen-forming ascomycete *Cetraria islandica* (Icelandic moss). *New Phytologist* 150, 3, 739-746.
- Iacomini, M., Gorin, P. A. J., Baron, M., Tulloch, A. P., Mazurek, M., 1988. Novel D-glucans obtained by dimethyl sulfoxide extraction of the lichens *Letharia vulpina*, *Actinogyra muehlenbergii*, and na *Usnea* sp. *Carbohydr. Res.* 176, 117 - 126.
- Jansson, P. E., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B., Lönnngren, J., 1976. A practical guide to the methylation of sugars. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (Univ. of Stockholm) 48, 1-70.
- Louwhoff, S. H. J. J., Crisp, M. D., 2000. Phylogenetic analysis of *Parmotrema* (Parmeliaceae: Lichenized Ascomycotina). *The Bryologist* 103, 541-554.
- Meyer, K. H., Gürtler, P., 1947(a). Recherches sur l'amidon. XXXI. La constitution de la lichénine. *Helv. Chim. Acta* 30, 751-761.
- Meyer, K. H., Gürtler, P., 1947(b). Recherches sur l'amidon. XXXII. L'isolichénine. *Helv. Chim. Acta* 30, 761-765.
- Nishikawa, Y., Ohki, K., Takahashi, K., Kurano, G., Fukuoka, F., Emori, M., 1974. Studies on the water soluble constituents of lichens. II. Antitumor polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea*, and *Cladonia* species. *Chem. Pharm. Bull.* 22, 2692-2702.
- Olafsdottir, E. S., Ingólfssdottir, K., 2001. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. *Planta Med.* 67, 199-208.
- Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L., Millet, M. A., 1954. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.* 37, 336-343.
- Sasaki, G. L., Reis, R. A., Gorin, P. A. J., Iacomini, M., 2002. The glucans of lichenized fungi. *Mitt. Inst. Allg. Bot.* 30, 195-211.

- Shibata, S., 1973. Polysaccharides of lichens. J. Nat. Science Council Sri Lanka 1, 183-188.
- Stuelp, P. M., Carneiro Leão, A. M. C., Gorin, P. A. J., Iacomini, M., 1999. The glucans of *Ramalina celastri*: relation with chemotypes of other lichens. Carbohydr. Polym. 40, 101-106.
- Wolf from, M. L., Thompson, A., 1963(a). Redution with sodium borohydride. In: Whistler, R. L., Wolf from, M. L. (eds.). Meth. Carbohydr. Chem. 2, 65-68.
- Wolf from, M. L., Thompson, A., 1963(b). Acetylation. In: Whistler, R. L., Wolf from, M. L. (eds.) Meth. Carbohydr. Chem. 2, 211-215.
- Woranovicz-Barreira, S. M., Gorin, P. A. J., Sassaki, G. L., Tischer, C. A., Ahti, T., Iacomini, M., 1999. Chemotyping studies on the glucans of lichens of the genus *Cladonia*. Phytochemistry 52, 1069-1074.
- Yokota, I., Shibata, S., Saitô, H., 1979. ¹³C-n.m.r. analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens. Carbohydr. Res. 69, 252-258.



Scheme 1. Extraction and purification of the glucans obtained from *Parmotrema* and *Rimelia* spp.

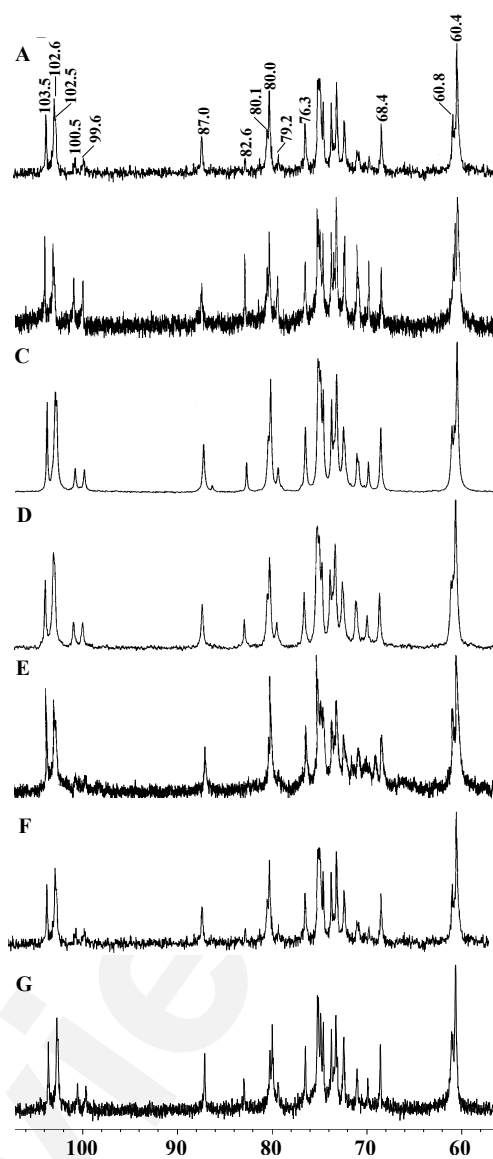


Fig. 1. ^{13}C NMR spectra of freeze-thawed precipitate fraction (FTP) obtained from *Parmotrema austrosinense* (A), *P. delicatulum* (B), *P. mantiqueirense* (C), *P. schindlerii* (D), *P. tinctorum* (E), *Rimelia cetrata* (F), and *R. reticulata* (G).

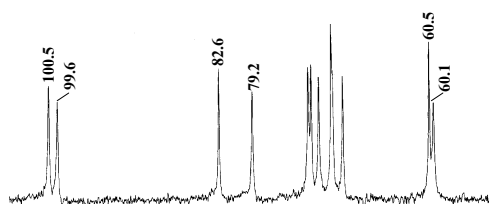


Fig. 2. ^{13}C NMR spectrum of PIAA fraction obtained from *Rimelia cetrata* in $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ at 50°C (chemical shifts are expressed as δ , ppm).

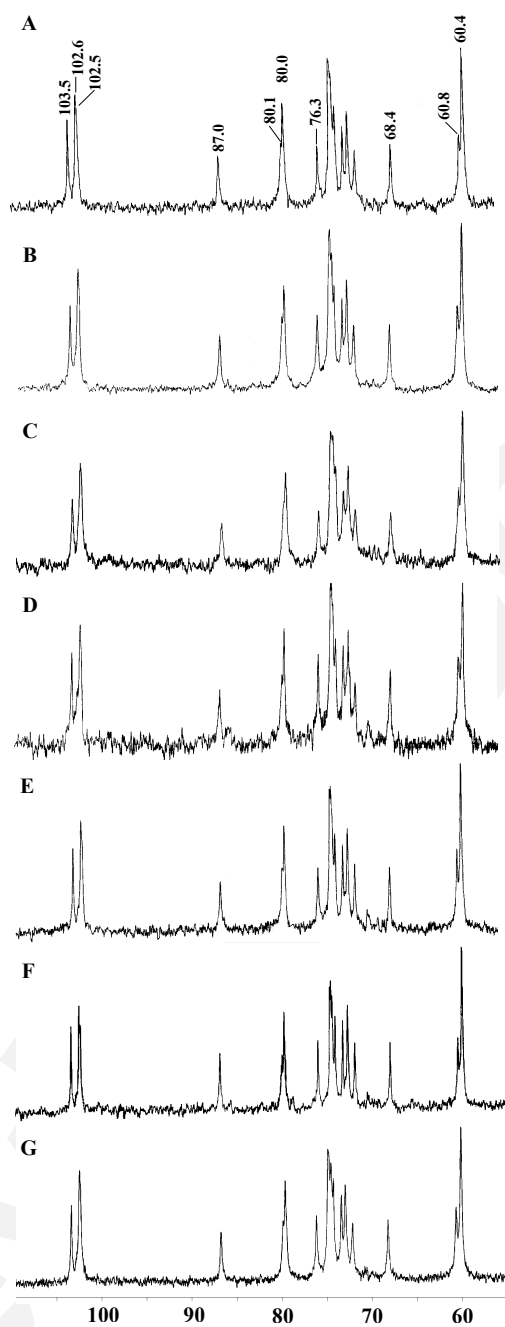


Fig. 3. ^{13}C NMR spectra of PSAA fraction obtained from *Parmotrema austrosinense* (A), *P. delicatulum* (B), *P. mantiqueirense* (C), *P. schindlerii* (D), *P. tinctorum* (E), *Rimelia cetrata* (F), and *R. reticulata* (G).

Galactomannans with novel structures from the lichen *Roccella decipiens* Darb.

Elaine R. Carbonero, Lucimara M. C. Cordeiro, Caroline G. Mellinger,
Guilherme L. Sassaki, Elfriede Stocker-Wörgötter, Philip A. J. Gorin and Marcello Iacomini*

Galactomannan fractions, isolated from the lichen *Roccella decipiens*, consisted of highly substituted polysaccharides composed of a (1→4)-linked α -Manp main-chain, partially substituted at O-2 by various side chains. The fine structure of these galactomannans is reported for the first time.

Galactomannans with novel structures from the lichen

***Roccella decipiens* Darb.**

Elaine R. Carbonero,¹ Lucimara M. C. Cordeiro,² Caroline G. Mellinger,¹ Guilherme L. Sasaki,¹ Elfriede Stocker-Wörgötter,³ Philip A. J. Gorin¹ and Marcello Iacomini^{1,*}

¹ *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná ,UFPR, CP 19.046, CEP 81.531-990, Curitiba, PR, Brasil*

² *Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, CEP 85819-110, Cascavel, PR, Brasil*

³ *Institute of Plant Physiology, University of Salzburg, Hellbrunner Str. 34, A-5020 Salzburg, Austria*

* Corresponding author. Tel.: +55 (41) 3611655; Fax: +55 (41) 266 2042; *E-mail address: iacomini@ufpr.br*

Abstract - Galactomannan fractions were isolated from the lichen *Roccella decipiens*. One consisted of a highly substituted galactomannan composed of a (1→4)-linked α -Manp main-chain, partially substituted at O-2 by side chains of α -(1→2) and α -(1→6)-linked Manp residues. The Galf units were attached to the end of the Manp side chains, probably linked to O-6. The structure of the other polysaccharide was similar, although it with a greater proportion of Galf units, not only as terminal residues, but mainly as 5-O-, 6-O- and 5,6-di-O- substituted units. The fine structure of these galactomannans is reported for the first time.

Keywords: Lichen; *Roccella decipiens*; polysaccharides; galactomannans; chemical structure

1. Introduction

Lichens are slow-growing symbiotic organisms consisting of a fungus and one or more algae, and about 13.500 species grow world wide. The chemistry of secondary metabolism has been more extensively investigated and over 200 different secondary compounds have been reported.^{1,2} However, less than 100 species of lichens have been investigated for their polysaccharide constituents and these have been divided into three main structural types: namely linear or lightly substituted α - and β -glucans and branched galactomannans.³⁻⁶ Recently new complex heteroglycans, like such as a rhamnogalactofuranan⁷ and galactomannoglucans have been described.^{8,9}

The main chain of the already investigated galactomannans generally consists of (1→6)-linked α -Manp units, and their structural differences arose from the degree and

sequence in which these units are unsubstituted, or substituted at O-2, O-4 and O-2,4 by various side chains containing units of α - or β -Galp, α -Manp or Glcp, and more rarely β -Galf. The ratio of Man/Gal/Glc is variable.^{3-5,10} These heteropolysaccharides have been isolated from a number of different lichen spp., belonging mainly only to the families Cladoniaceae, Parmeliaceae, Umbellariaceae, Ramalinaceae and Stereocaulaceae,^{5,11} thus leaving a large research field to be exploited.

Lichen polysaccharides, which can be isolated in high yield, such as the glucans and galactomannans, are generally expected to be of fungal origin.⁴ Cordeiro et al. (2004)¹² found for a *Ramalina* sp., that the nigeran- and laminaran-type glucans and galactomannans were produced by the cultivated mycobiont, while the water-soluble isolichenan-type glucan was found only in the symbiotic thallus. Moreover, the cell-wall polysaccharides of lichen-forming fungi can be more complex than those of free-living fungi, due to their co-evolution with algal symbionts and their longevity.¹⁴ The majority lichens investigated so far for their polysaccharide components are lichenized with trebouxoid photobionts, despite 32 genera of alga having been identified to date as photobionts.^{15,16} The influence of the nature of the photobiont on overall polysaccharide content of the lichen thallus is still unknown.

Polysaccharides from the lichen *Roccella decipiens*, which has a *Trentepohlia* sp. as photobiont, have now been characterized. As far as we know, this is the first report elucidating the chemical structure of heteropolysaccharides from a lichen species, lichenized with a *Trentepohlia* photobiont.

2. Results and discussion

In order to remove lipids, pigments and hydrophobic material, the lichen thallus (13 g) was extracted successively with CHCl_3 -MeOH and MeOH- H_2O . The defatted lichen was then submitted to successive extraction with hot water at 100 °C and aq. 2% KOH (Fig. 1) and after neutralization (HOAc) the extracted polysaccharides (W and K fractions, respectively) were recovered by ethanol precipitation. Fraction K was obtained in 8.1% yield, while fraction W had a low carbohydrate content (2.5%). Fractions W and K had the same carbohydrate content, and as fraction K was isolated in a higher yield, it was chosen for polysaccharides purification. It was submitted to freeze-thawing treatment, resulting in a cold-water insoluble (IK, 1.7% yield) and soluble (SK, 5.4% yield) fractions. SK was then treated with Fehling solution, giving rise to a precipitate (FP, 3.4% yield) and supernatant (FS, 2.0% yield) fractions.

Fraction FP was composed of mannose and galactose (Table 1) and gave a single peak on HPSEC analysis, with M_w of 20.5×10^4 (dn/dc 0.114), while FS had a heterogeneous elution profile, being further purified by ultrafiltration (10 kDa M_r cut off membrane), giving rise to eluted (EFS) and retained (RFS) material. Comparison of the monosaccharide compositions (Table 1) and ^{13}C NMR spectra of fractions EFS and RFS revealed their similarity, suggesting that they must contain the same polysaccharide, but with different molar masses (EFS M_w 27.8×10^3 ; RFS M_w 46.4×10^3 ; dn/dc 0.132). According to Pereyra et al. (2003)¹⁴ the mass differences are justified and explained as a result of the severe environmental conditions to which the thalli are exposed during their long life, which promote a partial degradation of their components.

Methylation analysis of FP showed it to have a highly branched structure. Units of Galf were detected mainly at terminal positions and in small amounts as 2-*O*-, 5-*O*-, 6-

O- and 5,6-di-*O*-substituted residues. Non-reducing end units of Manp, 2-*O*-, 4-*O*-, 6-*O*- and 2,4-di-*O*-substituted Manp units were also observed (Table 2).

The ^{13}C NMR spectrum of FP contained several signals in the C-1 region, consistent with a complex structures (Fig. 2A). The C-1 signals of β -Galf units ($J_{\text{C-1,H-1}} = 175.5$ Hz) appeared at δ 109.1 were from to the terminal units,^{17,18} and small signals at δ 108.0-106.8 corresponded to units substituted at O-2, O-5, O-6 and O-5,6; data in agreement with the methylation data (Table 2). Other signals at δ 84.1, δ 82.0, δ 77.9, and 63.8 and 63.6 corresponded respectively to the C-4, C-2, C-3 and C-6 of the β -Galf non-reducing end units. The signals from δ 99.6 to δ 102.2 are from Manp units, namely δ 102.2 are from non-reducing end units, and those at δ 101.3, 100.3, 100.2, and 99.6 are from 2-*O*-, 6-*O*-, 4-*O*-substituted and 2,4-*O*-disubstituted Manp residues.^{4,19} The Manp units have an α -glycosidic configuration by virtue of coupling constant values ($J_{\text{C-1,H-1}} = 172.7$ Hz).¹⁷

Other ^{13}C NMR signals were detected at δ 68.3, 63.8, and 62.1/ 61.8, suggesting *O*-substituted $-\underline{\text{CH}}_2-6$ from α -Manp (1 \rightarrow 6)- linked units, non substituted $-\underline{\text{CH}}_2-6$ from β -Galf, and non substituted $-\underline{\text{CH}}_2-6$ from α -Manp non-reducing end, 2-*O*-, 4-*O*- and 2,4-di-*O*-substituted units, respectively. These assignments were confirmed by the inversion of CH_2 groups in HSQC-DEPT experiments.

Methylation analysis was also carried out on the RFS fraction (Table 2), and showed greater amounts of terminal and 5-*O*-, 6-*O*-, and 5,6-di-*O*-substituted Galf units when compared with fraction FP. Moreover, it gave rise to the same methylated derivatives of Manp, but in smaller amounts. The ^{13}C NMR spectrum of the fraction (Fig. 3A) is in agreement to these data, with intense anomeric signals of β -Galf at the low-field of δ 109.0 and 108.8 [β -Galf-(1 \rightarrow)], δ 108.0 [\rightarrow 5,6)- β -Galf-(1 \rightarrow)], δ 107.9 [\rightarrow

5)- β -Gal f -(1 \rightarrow)] and δ 107.3 [\rightarrow 6)- β -Gal f -(1 \rightarrow)].^{20,21} Small signals of Man p were present at δ 102.3, δ 101.3, δ 100.2 and δ 99.5.

A partial acid hydrolysis, that selectively eliminated Gal f residues, was performed to isolate and study the mannan core of the two fractions (FP and RFS). Monosaccharide analysis of the core from FP and RFS showed mainly mannosyl units (Table 1). Methylation analysis (Table 2) showed only small amounts of the 2,3,5,6-Me₄Gal acetate derivative, with no others methyl galactitol acetates being detected, indicating that they were efficiently removed by partial hydrolysis. Both fractions contained similar amounts of nonreducing-end of Man p , 2- O -, 4- O -substituted and 2,4-di- O -substituted Man p units. Moreover, a decrease in the proportion of the 6- O -substituted Man p residues was detected. The signals observed in the anomeric region of their ¹³C NMR spectra (Fig. 2B and 3B) agreed with the methylation data, having only the C-1 signals at δ 99.5-102.4 from Man p units, while those of the Gal f units were removed. The increase in the proportion of residues of terminal Man p and the decrease of those of 6- O -substituted Man p residues after partial hydrolysis indicates that the removed Gal f units in both fractions were attached to those of Man p (probably linked to O-6) in the side chains, and not to the main chain.

The main-chain structure of FP and RFS was determined via a controlled Smith degradation, which gave rise to polysaccharides (SmFP and SmRFS, respectively) composed only of mannose (Table 1). Methylation analysis indicated linear (1 \rightarrow 4)-mannans (Table 2), which is in agreement with their ¹³C NMR spectra (Fig. 2C and 3C), with signals at δ 101.5 (C-1), δ 73.8 (C-4 and C5), δ 71.9 (C-3), δ 71.4 (C-2) and δ 62.1 (C-6).¹⁸

According to the above data, fraction FP consists of a highly branched galactomannan consisting of a (1 \rightarrow 4)-linked α -Man p main-chain, partially substituted

at O-2 by side chains of α -(1 \rightarrow 2) and α -(1 \rightarrow 6)-linked Manp units. The Galp moieties are attached to the end of the side chains of mannose, probably at O-6. The structure of RFS is basically the same, although it contains a greater proportion of Galp, not only as terminal residues, but mainly as 5-*O*- and 6-*O*- and 5,6-di-*O*-substituted units.

We have not found any basic similarities with other heteropolysaccharides previously isolated from lichens, which usually have main chains of (1 \rightarrow 6)-linked α -mannopyranosyl units, substituted mainly at O-2, O-4 or O-2,4 by units of α - or β -Galp, α -Manp or Glcp, and more rarely by β -Galp.^{3-5,10} Mannose-containing heteropolysaccharides have been isolated from some species of lichens, mainly from the families Cladoniaceae, Parmeliaceae, Umbellariaceae, Ramalinaceae and Stereocaulaceae,^{4,5,11} which are lichenized with a trebouxoid alga as primary photobionts.^{15,22} On the other hand, *R. decipiens*, contains galactomannans with new structures, and is lichenized with a photobiont of the genus *Trentepohlia*, a green filamentous alga.

Whether the nature of the photobiont exerts any influence on the polysaccharide content of the lichen thallus is still unknown. An extension of the present study to other genera having different photobionts could be very useful to establish the relationship of polysaccharide structure and the nature of the mycobiont-photobiont association.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Gas liquid chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was performed using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap model 810 R-12 mass

spectrometer, with He as carrier gas. A capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.) of DB-225, held at 50 °C during injection and then programmed at 40 °C min⁻¹ to 220°C (constant temperature) was used for quantitative analysis of alditol acetates and partially *O*-methylated alditol acetates.

¹³C NMR spectra were obtained using a Bruker DRX 400 or Bruker AvanceTM 500 spectrometer incorporating Fourier transform. Analyses were performed at 50 °C, with samples being dissolved in D₂O or in Me₂SO-*d*₆. Chemical shifts of water-soluble samples are expressed in δ, ppm relative to acetone at δ 30.20 and 2.22 for ¹³C and ¹H signals, respectively and at δ 39.70 (¹³C) and 2.40 (¹H) for those soluble in Me₂SO-*d*₆.

Ultrafiltration through *M_r* 10 kDa cut-off membranes (Millipore, regenerated cellulose) was carried out to further purify the samples.

3.2. Collection of lichenized fungi

The foliose thalli of *R. decipiens* was collected by Dr. E. Stocker-Wörgötter in Peninsula of Baja California (Mexico), in May of 2002. A voucher sample is deposited in the private collection of E. Stocker-Wörgötter, number 526 and a duplicate voucher sample in the UPCB (Herbarium name follows Holmgren *et al.*²³), registration number 49052.

3.3. Extraction and purification of polysaccharides

The lichen thallus of *R. decipiens* was first extracted with 2:1 (v/v) CHCl₃-MeOH at 60 °C for 2 h (x 3, 250 mL each) and then with 4:1 (v/v) MeOH-H₂O at 60 °C for 2 h (x 3, 250 mL each), to remove low molecular weight material. The residue was submitted to

sequential extraction (Fig. 1) with water at 100 °C for 3 h (x 3, 300 mL each) and 2% aq. KOH at 100 °C for 3 h (x 3, 300 mL each). The resulting extracts were neutralized (HOAc), added to ethanol (3 vol.) and the resulting polysaccharide precipitates were dissolved in water and dialyzed, giving rise to fractions W and K respectively. Fraction K was frozen and then allowed to thaw slowly, and resulting insoluble material (fraction IK) was centrifuged off. The supernatant (SK) was treated with Fehling solution²⁴ and precipitated material (FP) centrifuged off. Both, FP (precipitate) and FS (supernatant) fractions, were neutralized with HOAc, dialyzed against tap water, deionized with mixed ion exchange resins, and then freeze-dried.

Fraction FS was further purified by ultrafiltration through membranes of 10 kDa M_r cut-off (Millipore- regenerated cellulose), giving rise to eluted (EFS) and retained (RFS) material.

3.4. Monosaccharide composition

Monosaccharide components of the polysaccharides and their ratios were determined by hydrolysis with 2 M TFA for 8 h at 100 °C, followed by conversion to alditol acetates (GC-MS) by successive NaBH₄ reduction and acetylation with Ac₂O-pyridine (1:1, v/v) for 12 h, at room temperature.^{25,26}

3.5. Determination of homogeneity of polysaccharides and their molecular weight

The homogeneity and molar mass (M_w) of water-soluble polysaccharides were determined by high performance steric exclusion chromatography (HPSEC), using a multidetection equipment in which a differential refractometer (Waters) and a

multiangle laser light scattering apparatus (MALLS; Dawn DSP-F, Wyatt Technology) were adapted on-line. The eluent was 0.1 M NaNO₃, containing 0.5 g/L NaN₃. The polysaccharide solution was filtered through a membrane, with pores of 0.2 µm diameter (Millipore).

The specific refractive index increment (dn/dc) was determined, with the samples being dissolved in 50 mM NaNO₃ and five increasing concentrations, ranging from 0.2 to 1.0 mg/mL, were used to determine the slope of the increment.

3.6. Methylation analysis of polysaccharides

Samples were *O*-methylated using NaOH-Me₂SO-MeI.²⁷ The per-*O*-methylated derivatives were hydrolyzed with 50% v/v sulfuric acid (1 h, 0 °C), followed by dilution to 5.5% v/v (14 h, 100 °C), neutralization (BaCO₃), and filtration.²⁸ The resulting mixture of *O*-methylaldoses was reduced with NaBD₄ and acetylated as cited above to give a mixture of partially *O*-methylated alditol acetates, which was analyzed by GC-MS.

3.7. Partial acid hydrolysis

Fractions FP and RFS were submitted to partial acid hydrolysis with aq. trifluoroacetic acid, pH 2.0 for 18 h at 100 °C, under reflux. The neutralized materials (HFP) were dialyzed (2 kDa M_r cut-off membrane) and freeze-dried.

3.8. Isolation of the mannan core

The FP and RFS (150 mg) fractions were oxidized in 0.05 M NaIO₄ (20 mL) at room temperature, in the dark for 96 h. To stop the reaction, 1,2-ethanediol was added, the solution dialyzed, and the resulting polyaldehydes reduced with sodium borohydride. After neutralization with HOAc followed by dialysis, the material was partially hydrolyzed with aq. trifluoroacetic acid, pH 2.0 for 30 min at 100 °C.²⁹ The neutralized material was dialyzed (2 kDa *M_r* cut-off membranes) and the polysaccharide core recovered and freeze-dried.

Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES and Fundação Araucária for financial support.

References

1. Culberson, C. F.; Elix, J. A. *Methods Plant Biochem.* **1989**, *1*, 509-535.
2. Huneck S.; Yoshimura, I. *Identification of lichen substances*, Springer Verlag, Berlin, 1934.
3. Gorin, P. A. J.; Baron, M.; Iacomini, M. Storage products of lichens. In *CRC Handbook of Lichenology*, Galun, M., Ed.; CRC Press, Boca Raton, 1988; Vol. III, pp 9-23.
4. Gorin, P. A. J.; Baron, M.; da Silva, M. L. C.; Teixeira, A. Z. A.; Iacomini, M. *Ciência Cultura (Brazil)* **1993**, *45*, 27-36.
5. Olafsdottir, E. S.; Ingólfssdottir, K. *Planta Med.* **2001**, *67*, 199-208.

6. Sasaki, G. L.; Reis, R. A.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. *Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg* **2002**, *30*, 195-211.
7. Olafsdottir, E. S.; Omarsdottir, S.; Paulsen, B. S.; Jurcick, K.; Wagner, H. *Phytomedicine* **1999**, *6*, 273-279.
8. Woranovicz-Barreira, S. M.; Gorin, P. A. J.; Sasaki, P. L.; Marcelli, M.; Iacomini, M. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *181*, 313-317.
9. Carbonero, E. R.; Montai, A. V.; Woranovicz-Barreira, S. M.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 681-686.
10. Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. *Carbohydr. Res.* **1985**, *142*, 253-267.
11. Cordeiro, L. M. C.; Stocker-Wörgötter, E.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 967-975.
12. Cordeiro, L. M. C.; Stocker-Wörgötter, E.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *238*, 79-84.
13. Lutzoni, F. M.; Pagel, M. *Proc. Nat. Acad. Sciences USA* **1997**, *94*, 11422-11427.
14. Pereyra, M. T.; Prieto, A.; Bernabé, M.; Leal, J. A. *The Lichenologist* **2003**, *35*, 177-185.
15. Tschermak-Woess, E. The algal partner. In *Handbook of Lichenology*, Galun, M., Ed.; CRC Press, Boca Raton, 1988; Vol. I, pp. 39-92.
16. Ahmadjian, V. *The Bryologist* **1993**, *96*, 310-313.
17. Perlin, A. S.; Casu, B. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *34*, 2919-2924.
18. Gorin, P. A. J.; Mazurek, M. *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 1212-1223.
19. Gorin, P. A. J.; Haskins, R. H.; Travassos, L. R.; Mendonça-Previato, L. *Carbohydr. Res.* **1977**, *55*, 21-33.
20. Leal, J. A.; Prieto, A.; Gómez-Miranda, B.; Jiménez-Barbero, J.; Bernabé, M. *Carbohydr. Res.* **1993**, *244*, 361-368.

21. Nagaoka, M.; Hashimoto, S.; Shibata, H.; Kimura, I.; Kimura, K.; Sawada, H.; Yokokura, T. *Carbohydr. Res.* **1996**, *281*, 285-291.
22. Friedl, T.; Büdel, B. Photobionts. In *Lichen biology*, Nash III, T. H., Ed.; Cambridge, Cambridge University Press, 1996; pp. 113-119.
23. Holmgren, P. K.; Holmgren, N. H.; Barnett, L. C. *Index Herbariorum.* **1990**, *120*, 1-693.
24. Jones, J. K. N.; Stoodley, R. J. *Methods Carbohydr. Chem.* **1965**, *5*, 36-38.
25. Wolfrom, M. L.; Thompson, A. *Methods Carbohydr. Chem.* **1963a**, *2*, 65-67.
26. Wolfrom, M. L.; Thompson, A. *Methods Carbohydr. Chem.* **1963b**, *2*, 211-215.
27. Ciucanu, I.; Kerek, F. *Carbohydr. Res.* **1984**, *131*, 209-217.
28. Saeman, J. F.; Moore, W. E.; Mitchell, R. L.; Millet, M. A. *Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.* **1954**, *37*, 336-343.
29. Hay, G. W.; Lewis, B. A.; Smith, F. *Meth. Carbohydr. Chem.* **1965**, *5*, 357-360.

Table 1. Monosaccharide composition of fractions obtained from *Roccella decipiens*

Fraction	Monosaccharide composition (mol %) ^a		
	Mannose	Galactose	Glucose
FP	80.6	19.1	0.3
HFP	95.5	3.4	1.1
SmFP	100	-	-
EFS	46.2	53.3	0.5
RFS	43.1	55.7	1.2
HPRFS	97.6	2.1	0.3
SmRFS	100	-	-

^a Alditol acetates obtained on successive hydrolysis, reduction and acetylation, analyzed by GC-MS (column DB-225).

Table 2. Analysis of partially *O*-methylated alditol acetates obtained from methylated fractions isolated from the lichen *Roccella decipiens*

OMe-alditol acetates ^a	FRACTIONS (% values) ^b						Linkage type ^c
	FP	HFP	SmFP	RSF	HFS	SmRFS	
2,3,5,6-Me ₄ Gal	13.7	1.8	-	18.6	0.8	-	Gal β -(1→
3,5,6-Me ₃ Gal	0.5	-	-	0.3	-	-	→2)-Gal β -(1→
2,3,6-Me ₃ Gal	0.9	-	-	23.6	-	-	→5)-Gal β -(1→
2,3,5-Me ₃ Gal	0.7	-	-	7.8	-	-	→6)-Gal β -(1→
2,3-Me ₂ Gal	0.8	-	-	11.0	-	-	→5,6)-Gal β -(1→
2-MeGal	-	-	-	0.4	-	-	→3,5,6)-Gal β -(1→
2,3,4,6-Me ₄ Man	16.1	29.1	2.1	7.7	35.2	8.0	Man α -(1→
3,4,6-Me ₃ Man	11.0	11.2	-	5.3	15.5	-	→2)-Man α -(1→
2,3,6-Me ₃ Man	7.8	17.7	96.0	1.8	13.5	92.0	→4)-Man α -(1→
2,3,4-Me ₃ Man	12.2	2.7	-	5.5	2.8	-	→6)-Man α -(1→
4,6-Me ₂ Man	0.3	-	-	-	-	-	→2,3)-Man α -(1→
2,6-Me ₂ Man	-	-	-	0.2	-	-	→3,4)-Man α -(1→
3,6-Me ₂ Man	33.7	37.5	1.9	16.4	30.7	-	→2,4)-Man α -(1→
2,3-Me ₂ Man	0.3	-	-	0.2	-	-	→4,6)-Man α -(1→
3,4-Me ₂ Man	1.3	-	-	0.8	1.1	-	→2,6)-Man α -(1→
3-MeMan	0.7	-	-	0.4	0.4	-	→2,4,6)-Man α -(1→

^a O-Me-alditol acetates obtained on methylation analysis, followed by successive hydrolysis, reduction and acetylation, and analyzed by GC-MS (column DB-225).; ^b % of peak area relative to total peak area.;

^c Based on derived *O*-methylalditol acetates.

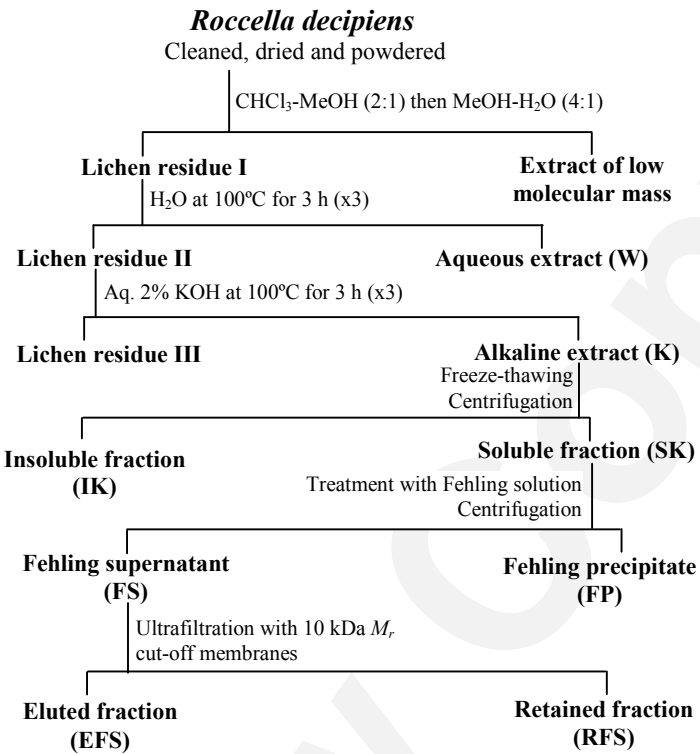


Figure 1. Scheme of extraction and purification of polysaccharides from the lichen *Rocella decipiens*

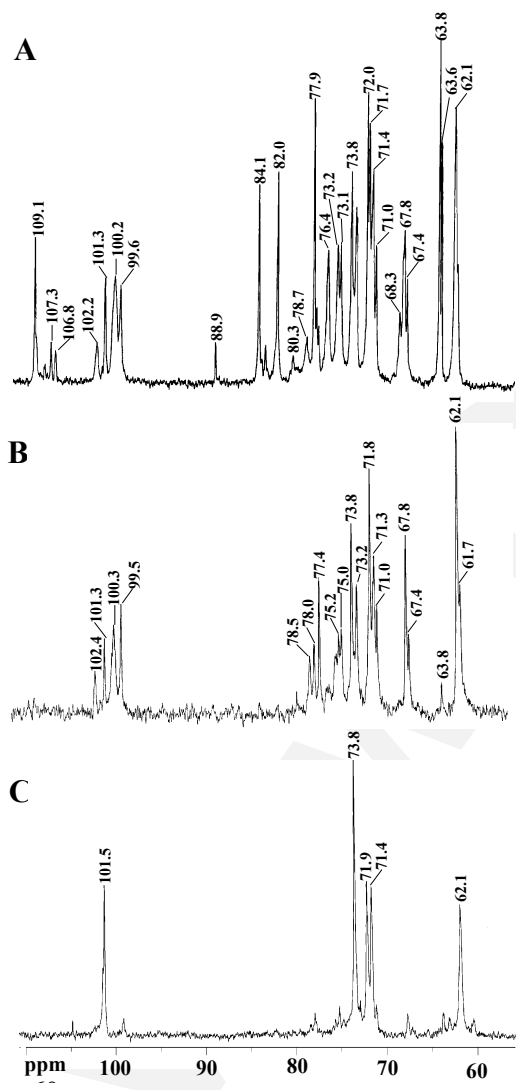


Figure 2. ^{13}C NMR spectra of FP (A), HFP (B) and SmFP (C) fractions

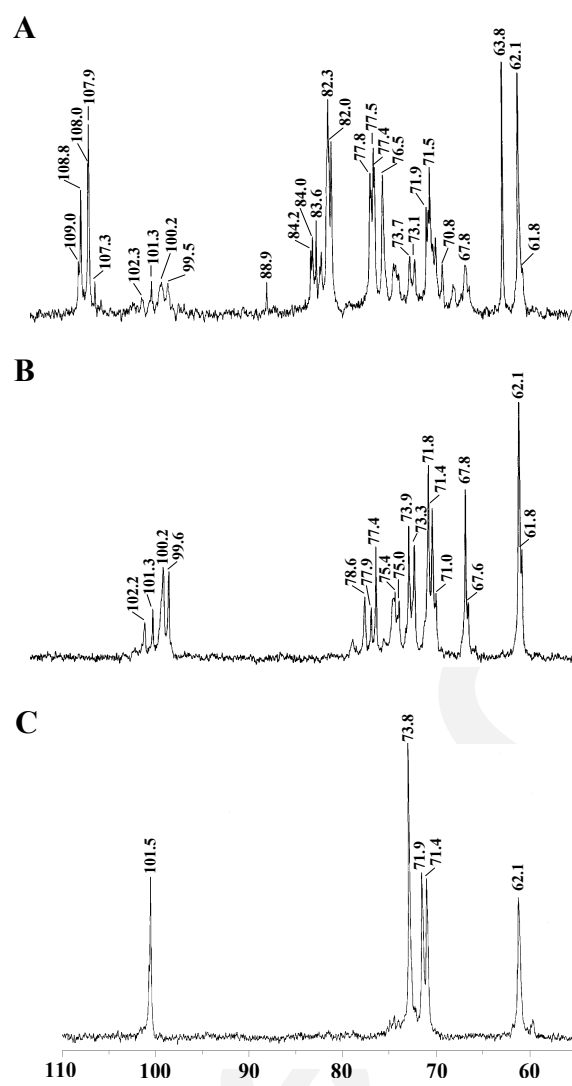


Figure 3. ^{13}C NMR spectra of FS (A), HFS (B) and SmRFS (C) fractions

**Structure of two glucans and a galactofuranomannan from the lichen
Umbilicaria mammulata (Ach.) Tuck. Gier Kendrick**

E.R. Carbonero^a, F.R. Smiderle^a, A.H.P. Gracher^a, C.G. Mellinger^a, G. Torri^b,
T. Ahti^c, P.A.J. Gorin^a, M. Iacomini^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, C.P. 19046,
81531-990, Curitiba-PR, Brasil*

^b*Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche "G. Ronzoni", Via Colombo n. 81, 20133, Milan, Italy*

^c*Department of Ecology and Systematics, P.O. Box 47, University of Helsinki, FIN-00014, Finland*

* Corresponding author: Tel.: +55 (41) 361 1655; Fax: +55 (41) 266 2042; E-mail adress: iacomini@ufpr.br (M. Iacomini)

Abstract

The three main polysaccharides from the lichenized fungus *Umbilicaria mammulata* were isolated and characterized. Their structures were determined using GC-MS of derived alditol acetates, GC-MS-methylation analysis and ^{13}C NMR spectroscopy. Two of them were (1→3)- and (1→6)-linked β -glucans, namely laminaran and pustulan, respectively. The other was a galactofuranomannan, which was analyzed as well as a galactose-free polysaccharide formed on partial hydrolysis. The former consisted of a main chain of (1→6)-linked α -mannopyranosyl residues, part of them being substituted at O-2, O-4, and O-2,4 by complex, branched side chains containing α -mannopyranosyl and β -galactofuranosyl units. This heteropolysaccharide is related to those of other Umbilicariaceae lichenized fungi, and its chemical characterization presents a useful tool for the systematics of lichenized fungi.

Keywords: *Lichen; Umbilicaria mammulata; galactofuranomannan; laminaran; pustulan*

1. Introduction

Lichen symbiosis is an evolutionary strategy that has resulted in a rich diversity of incorporated fungi (Grube and Kroken, 2000), resulting in 13,500 species growing worldwide (Galun, 1988). Of this great number, only about 100 species of lichens have so far been investigated for their polysaccharide components. The best known classes of polysaccharides present in lichens are glucans, galactomannans, and galactoglucomannans (Gorin, Baron, Corradi da Silva, Teixeira and Iacomini, 1993; Woranovicz, Pinto, Gorin and Iacomini, 1999), and recently reported complex heteroglycans, such as a rhamnogalactofuranan (Olafsdottir, Omarsdottir, Smestad Paulsen, Jurcic and Wagner, 1999) and galactomannoglucans. (Woranovicz-Barreira, Gorin, Sasaki, Marcelli and Iacomini, 1999; Carbonero, Montai, Woranovicz-Barreira, Gorin and Iacomini, 2002).

The structural diversity of the galactomannans from several lichenized fungi depend on their side-chain substituents on (1→6)-linked α -D-mannopyranosyl main-

chains (Gorin and Iacomini, 1985). These generally include monosubstituents at O-2 with units of α -D-Manp or α -D-Galp, at O-4 by β -Galp and sometimes with disubstituents at O-2 and O-4 by units of α -D-Galp and β -D-Galp, or α -D-Manp and β -D-Galp, respectively, although in several cases, some of the main-chain units are not substituted. A recent study on *Lasallia pustulata* demonstrated the presence of a galactomannan with complex side-chains of variable of α -(1 \rightarrow 2)-linked Manp and β -Galf (Pereyra, Prieto, Bernabé and Leal, 2003). Galactomannans have been isolated from several lichens, such as *Cladonia* spp., *Newropogon aurantiaco-ater*, *Collema leptosporum*, and *Ramalina usnea* among others (Gorin, Baron, Corradi da Silva, Teixeira and Iacomini, 1993; Olafsdottir and Ingólfssdottir, 2001).

Lichen polysaccharides have and are receiving much attention for their biological activities, concentrated on their antitumor, immunostimulatory, and antiviral properties (Olafsdottir and Ingólfssdottir, 2001). Since the structure of the polysaccharide is often typical of the parent genus and family level, they are also an important aid in chemotaxonomy studies (Teixeira, Iacomini and Gorin, 1995; Gorin, Baron, Corradi da Silva, Teixeira and Iacomini, 1993).

2. Experimental

2.1. Collection of *Umbilicaria mammulata*

Thalli of *Umbilicaria mammulata* was collected in 2002 by Prof. Dr. Teuvo Ahti, in State of Wisconsin, USA. A voucher sample was deposited in the herbarium of the Botany Department, University of Wisconsin, Madison, USA, number 61176 and a

duplicate in the UPCB herbarium (Herbarium of the Federal University of Paraná - UFPR), registration number 49053.

2.2. Extraction and fractionation of lichen polysaccharides

The thalli of *U. mammulata* (100 g) were cleaned, dried, and powdered, and then processed according to Fig.1. The sample was extracted with H₂O (600 ml) at 100 °C for 3 h (x 3), the residue isolated, which was then treated with 2% aq. KOH (600 ml) at 100 °C for 3 h (x 3), and the extract neutralized with HOAc. Each extract was added to excess EtOH (3:1; v/v) to form a precipitate. After dialysis, a freeze-thawing process was carried out on each supernatant and repeated until precipitates no longer appeared.

The precipitate PW formed following aq. extraction (19.4% yield) was isolated by centrifugation (4680 x g for 20 min, at 25 °C) and was ready for further analysis. The solution prepared from precipitate PK (7.9% yield) and the supernatant PS formed following KOH extraction (5.7% yield) were each treated with Fehling solution (100 ml) (Jones and Stoodley, 1965) and the insoluble Cu²⁺ complex formed was isolated by centrifugation (4680 x g for 20 min, at 25 °C). The respective complexes (FP-SK and FP-PK) and supernatants (FS-SK and FS-PK), were each neutralized with HOAc, dialyzed against tap water and deionized with Dowex 50 x 8 (H⁺ form) ion-exchange resin.

The FS-SK fraction was further purified by ultrafiltration through a M_r 10 kDa cut-off membranes (Millipore), furnishing retained (TrFS) and eluted (TeFS) fractions. The latter was then submitted to ultrafiltration with a M_r 300 kDa cut-off membrane, giving rise to retained (TZrFS) and eluted (TZeFS) fractions.

2.3. Preparation of polysaccharide (PM) containing O-acetyl groups

In order to check for the presence of acetyl groups, the lichen sample (7.0 g) was treated with Me₂SO (150 ml) at room temperature for 48 h. The extract obtained was precipitated with excess EtOH (3:1; v/v) and the resulting precipitate was centrifuged (as above), isolated, dialyzed against distilled water, and freeze-dried. The extract was then resuspended in water, frozen, and then thawed gently, resulting in the formation of a precipitate (PM; 19.8% yield) and soluble material.

2.3. Analysis of monosaccharides present in polysaccharides

Monosaccharide components and their ratios were determined by hydrolysis of polysaccharides (~1 mg) with 2 M TFA at 100 °C for 8 h. The hydrolyzates were evaporated to dryness and the residues submitted to successive reduction with NaBH₄ and acetylation with Ac₂O-pyridine (1:1, v/v; 2 ml) (Wolfrom and Thompson, 1963a, b). The resulting alditol acetates were analyzed by GC-MS using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a FINNIGAN MAT, model ITD 800 mass spectrometer, using a DB-225 capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.), with helium as carrier gas. The column was programmed from 50 °C (1 min) at 40°C/min to 230 °C (const. temp.). The products were identified by their typical retention times and electron impact profiles (Jansson, Kenne, Liedgren, Lindberg and Lönngren, 1976).

2.4. Methylation analysis of polysaccharides

Fractions TZeFS and PHTZeFS (5 mg) were O-methylated according to Ciucanu and Kerek (1984), using powdered NaOH in Me₂SO-MeI. The per-O-methylated

derivatives were treated with 50% v/v sulfuric acid (1 h, 0 °C) and the resulting solution diluted with H₂O to 5.5% v/v and completely hydrolyzed at 100 °C for 16 h. (Saeman, Moore, Mitchell and Millet, 1954). The solution was neutralized (BaCO₃), filtered and the filtrate, following evaporation to a small volume, was treated with NaB²H₄ to convert the partially *O*-methylated aldoses to alditol derivatives. The mixtures were analyzed by GC-MS, the DB-225 column (as above) being programmed from 50 °C (1 min) at 40 °C/min to 220 °C (const. temp.). The resulting partially *O*-methylated alditol acetates identified by their typical electron impact breakdown profiles and retention times (Jansson, Kenne, Liedgren, Lindberg and Lönngren, 1976; Carpita and Shea, 1987).

2.5. Partial acid hydrolysis of galactofuranosylmannan

Fraction TZeFS (300 mg) was partially hydrolyzed with a solution adjusted to pH 2.0 (20 ml) with aq. trifluoroacetic acid, at 100 °C, for 18 h. After neutralization with NaOH, a polymeric product (PHTZeFS) was obtained by precipitation with excess EtOH (3:1; v/v) from a small volume of water, and then retained on dialysis with a *M_r* 2 kDa cut-off membrane (86 mg).

2.6. Determination of homogeneity and molar mass of water-soluble polysaccharides

A Waters size exclusion chromatography (SEC) apparatus coupled to a differential refractometer (RI), and a Wyatt Technology Dawn-F Multi-Angle Laser Light Scattering (MALLS) detector was used for examination of soluble fractions (FS-SK and TzeFS). Four Waters Ultrahydrogel 2000/500/250/120 were connected in series

and coupled with a multidetection equipment. Samples, previously filtered through a membrane (0.22 μm ; Millipore), were injected (250 μl loop) at a 2 mg/ml concentration. The eluent was 0.1 mol/l aq. NaNO_3 with 200 ppm aq. NaN_3 .

The specific refractive index increment was determined by using a Waters 2410 refractive index detector. The value of dn/dc (differential refractive index increment of the solvent-solute solution with respect to a change in solute concentration), measured at 633 nm, was 0.133.

2.7. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

^{13}C NMR spectra were obtained using a 400 MHz Bruker model DRX Avance or 500 MHz Bruker AvanceTM 500 spectrometer. The ^{13}C NMR (100.6 MHz) analyses were performed at 50 °C or 30 °C, with the samples being dissolved in D_2O or $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, depending on solubility characteristics. Chemical shifts of the samples, dissolved in D_2O , are expressed in ppm (δ) relative to acetone at δ 30.20 for ^{13}C and at δ 39.70 (^{13}C) for those dissolved in $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$.

3. Results and discussion

The lichenized fungus *Umbilicaria mammullata* was submitted to hot aqueous and aq. 2% KOH extractions, followed by purification of component polysaccharides (Fig. 1). As one of the component glucans contained a small proportion of *O*-acetyl groups, the lichen was extracted with Me_2SO at 25 °C to avoid acetyl migration or removal. (Reicher, Corrêa and Gorin, 1984).

3.1. Isolation and characterization of glucan components

The lichen was extracted with Me₂SO and the extract was treated with ethanol to give a precipitate. This was subjected to freeze-thawing process, the water-insoluble fraction PM was obtained in a high yields (19.6% yield) containing 97% of glucose and consisted of a lightly *O*-acetylated (1→6)-linked glucan (pustulan) with a typical ¹³C NMR spectrum (Fig. 2), as recorded by Iacomini, Gorin and Baron (1988). It contained six major signals of the glucan at δ 103.1 (C-1), 76.4 (C-3), 75.4 (C-5), 73.3 (C-2), 69.9 (C-4), and 68.4 (*O*-substituted C-6). Minor signals were at δ 20.8 and 175.0 from –CH₃ and –C=O of *O*-acetyl groups respectively, while those at δ 77.7 and 71.2 were from *O*-acetylated carbons.

The alkaline extract of the lichen, following neutralization, was submitted to several freeze-thawing processes, followed by neutralization, until no more precipitate was found. The water-insoluble fraction (PK, 7.9% yield) was further purified via precipitation with Fehling solution. Both the precipitate (FP-PK, 7.1% yield) and supernatant (FS-PK, 0.5% yield) provided water-insoluble glucans. Fraction FP-PK had the same pustulan structure, except that the *O*-acetyl groups were removed by saponification. Fraction FS-PK was found to be a (1→3)-linked β-glucan (laminaran), since its ¹³C NMR spectrum (Fig. 3) contained six typical signals at δ 102.8 (C-1), 86.0 (*O*-substituted C-3), 76.2 (C-5), 72.7 (C-2), 68.3 (C-4), and 60.7 (C-6) (Carbonero, Sasaki, Stuelp, Gorin, Woranovicz-Barreira and Iacomini, 2001).

Glucans are polysaccharides found so far in all studied species of lichenized fungi. Partially *O*-acetylated pustulans are typical of Umbilicariaceae, and have been described for several species of *Umbilicaria*, such as *U. pustulata* and *U. hirsuta* (Drake, 1943), *U. angulata*, *U. caroliniana*, and *U. polyphylla* (Nishikawa, Tanaka, Shibata and

Fukooka, 1970). They have also been found in *Lasallia pustulata* (Pereyra, Prieto, Bernabé and Leal, 2003) and *Actinogyra muehlenbergii* (Iacomini, Gorin and Baron, 1988). Laminarans are extensively distributed throughout lichenized fungi of several families (Olafsdottir and Ingólfssdottir, 2001), also well as in free-living fungi (Gorin and Barreto-Bergter, 1983), and algae (Painter, 1983).

Of interest is question as to whether the *O*-acetyl groups are introduced during biosynthesis on to several hydroxyl groups of the pustulans, or specifically on to one hydroxyl group and then undergoing migration to other groups during the growth of the lichen? It is significant that the *U. mammulata* pustulan contains acetates only at C-3 and C-4, but not C-2 (Fig. 2), whereas that of *A. muehlenbergii* has acetates at C-2, C-3 and C-4 (Iacomini, Gorin and Baron, 1988). The migration mechanism thus appears unlikely.

3.2. Isolation and characterization of galactofuranomannan component

As can be seen from Fig. 1, the mother liquor of the freeze-thawing process following alkaline extraction (SK) was further fractionated. It was treated with Fehling solution to give a precipitate (FP-SK), which was discarded and material regenerated from the mother liquor FS-SK (4.6% yield) was subjected to membrane ultrafiltration. The polysaccharide (TeFS), which passed through a 10 kDa cut off membrane, was fractionated with a 300 kDa cut off membrane to give an eluted fraction (TZeFS) (3.1%). It gave a homogeneous profile when analyzed by HPSEC-MALLS with M_w 48×10^3 and $dn/dc = 0.133$. It contained Man, Gal, and Glc in a 65:33:2 molar ratio, showing a galactomannan structure.

Methylation analysis of TZeFS (Table 1) showed a highly branched structure based on derived partially *O*-methylated alditol acetates (GC-MS) with a high proportion of nonreducing end-units of *Manp* (15%) and *Galf* (25%). All the galactose was in a furanosyl form, and also included 2-*O*- (2%) and 5-*O*- (1%), 6-*O*- (2%), and 5,6-di-*O*-substituted units (1%). Other α -*Manp* units were non-substituted (3%), 2- (6%) and 6-*O*- (4%), 2,3- (4%), 4,6- (8%), 2,6- (13%) and 3,6-di-*O*- (3.5%), and 3,4,6- (1%), 2,4,6- (14%), and 2,3,6-tri-*O*-substituted (3%).

The ^{13}C NMR spectrum of the galactofuranomannan (Fig. 5A) corresponded to a highly complex polysaccharide with its many C-1 signals. Low field resonances from β -*Galf* units were present from δ 108.8, the main signal, to δ 105.2. To agree with the methylation data, the signal at δ 108.8 probably arises from non-reducing-end units, while the others are *O*-substituted. (Gorin, 1981; Leal, Prieto, Gómez-Miranda, Jiménez-Barbero, Bernabé, 1993; Nagaoka et al., 1996). The other C-1 signals are of α -*Manp* units and probably correspond the non-reducing-end groups linked (1 \rightarrow 2)- to another α -*Manp* unit (δ 103.3) which gives rise to a signal at δ 101.6). The signal at δ 100.1 should be from 6-*O*-substituted α -*Manp* units and that at δ 99.2 from 2,6-*O*-substituted units (Gorin, 1981). These occur at slightly lower field since the temperature of the D_2O is 30 °C is lower than that of the reference, which was 70 °C. It was also possible to observe signals from C-2, C-5 and C-6 of the nonreducing end-units of *Galf* in δ 83.9, 82.0 and 63.8, respectively (Gorin and Mazurek, 1975).

In order to elucidate further the structure of the core of the galactofuranomannan, partial acid hydrolysis was carried out to remove the majority of the *Galf* units. The product PHTZeFS, retained on dialysis, contained Man (94%), Gal (3%) and Glc (3%). Methylation-GC-MS analysis indicated (Table 1) mainly units of *Manp*, which were nonreducing end- (16%), 2- (39%), 4- (2%), and 6-*O*- (23%), 2,3- (1%), 4,6- (1%), and

2,6-di-*O*-substituted (14%). Non-hydrolyzed *Galf* nonreducing end-units (3%) were present as were 4-*O*-substituted *Glc_p* units (1%). ¹³C-NMR examination (Fig. 5B) agreed with the removal of β-*Galf* units, as their signals were barely detectable. The C-1 region of PHTZeFS can be interpreted in terms of a principal structure with a (1→6)-linked α-*Man_p* main-chain partially substituted at O-2 with (1→2)-linked α-*Man_p* side-chains. The key signals (Fig. 5B), as in the parent galactofuranomannan, are δ 103.2 (α-*Man_p*-(1→2)-α-*Man_p*), 101.6 (α-*Man_p*-(1→2)-α-*Man_p*), 100.5 (nonsubstituted (1→6)-linked α-*Man_p*) and 99.2 (2,6-di-*O*-substituted α-*Man_p*). Such structures are common in yeast mannans (Gorin and Barreto-Bergter, 1983). C-2 signal arising from 3 types of 2-*O*-substituted α-*Man_p* units are present at 79.1, 79.6, and 79.8.

The results of our investigation show the presence of two β-glucans, pustulan and laminaran, and a galactofuranomannan with a (1→6)-linked α-*Man_p* main-chain mainly substituted at O-2, O-4, and O-2,4 with β-*Galf*- and α-*Man_p*-containing side chains. The content of pustulan was higher when compared to those of the other polysaccharides and it represents a significant chemotaxonomic marker, as it is a very typical polymer from the Umbilicariaceae. The above structure of the galactofuranomannan with a high content of *Galf* units and a varying length of its α-*Man_p* side chains, seems to be typical of Umbilicariaceae, having been also found in *U. pustulata*, *U. spodochoa* (Kjølberg and Kvernheim, 1989), and *Lasallia pustulata* (Pereyra, Prieto, Bernabé and Leal, 2003). Such heteropolysaccharides from lichenized fungi are being extensively investigate in our laboratory due to their chemotaxonomic significance and possible biological activity.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and PRONEX-Carboidratos/Fundação Araucária for financial assistance.

References

- Carbonero, E. R., Sasaki, G. L., Stuelp, P., Gorin, P. A. J., Woranovicz-Barreira, S. M., & Iacomini, M. (2001). Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. *FEMS Microbiological Letters*, 194, 65-69.
- Carbonero, E. R., Montai, A. V., Woranovicz-Barreira, S. M., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2002). Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladina* spp.: significance as chemotypes. *Phytochemistry*, 61, 681-686.
- Carbonero, E. R., Tischer, C. A., Cosentino, C., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2003). Structural of a galactomannan from the cyanolichen *Leptogium azureum*. *Carbohydrate Polymers*, 53, 469-473.
- Carpita, N. C., & Shea, E. (1987). Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: Biermann, C. J., & McGinnis, G. D. (Eds.), *Analysis of carbohydrates by GLC and MS* (pp. 157-216). Boca Raton: CRC Press.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209-217.
- Drake, B. (1943). Some polyglucides of lichens, particularly lichenin and newly discovered pustulin. *Biochemistry*, 313, 338-399.
- Galun, M. (1988). Lichenization. In M. Galun (Ed.), *CRC Handbook of Lichenology (Vol. 3)* (pp. 153-159). Boca Raton: CRC Press.
- Gorin, P. A. J., & Mazurek, M. (1975). Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Canadian Journal of Chemistry*, 53, 1212-1223.

- Gorin, P. A. J. (1981). Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 38, 13-104.
- Gorin, P. A. J., & Barreto-Bergter, E. M. (1983). The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In G. O. Aspinall (Ed.), *The Polysaccharides (Vol. 2)* (pp.365-409). New York: Academic Press.
- Gorin, P. A. J., Baron, M., da SILVA, M. L. C., Teixeira, A. Z. A., & Iacomini, M. (1993). Lichen carbohydrates. *Ciência e Cultura (Brazil)*, 45, 27-36.
- Grube, M., & Kroken, S. (2000). Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. *Mycological Research*, 11, 1284-1294.
- Iacomini, M., Gorin, P. A. J., & Baron, M. (1988). Novel D-glucans obtained by dimethyl sulfoxide extraction of the lichens *Letharia vulpina*, *Actinogyra muehlenbergii*, and an *Usnea* sp. *Carbohydrate Research*, 176, 117-126.
- Jansson, P., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B., & Lönngrén, J. (1976). A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *University of Stockholm Chemical Communications*, 48, 1-70.
- Jones, J. K. N., & Stoodley, R. J. (1965). Fractionation using copper complexes. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 36-38.
- Kjølberg, O., & Kvernheim, A. L. (1989). Studies on the polysaccharides of lichens. III. The structure of alkali-soluble polysaccharides in *Umbilicaria pustulata* (L.) Hoffm. and *Umbilicaria spodochroa* (Ach.) Hoffm. *Acta Chemica Scandinavica*, 43, 280-285.
- Leal, J. A., Prieto, A., Gómez-Miranda, B., Jiménez-Barbero, J., & Bernabé, M. (1993). Structure and conformational features of an alkali- and water-soluble galactomannan from the cell walls of *Eupenicillium crustaceum*. *Carbohydrate Research*, 244, 361-368.
- Nagaoka, M., Hashimoto, S., Shibata, H., Kimura, I., Kimura, K., Sawada, H., & Yokokura, T. (1996). Structure of a galactan from cell walls of *Bifidobacterium catenulatum* YIT4016. *Carbohydrate Research*, 281, 285-291.
- Nishikawa, Y., Tanaka, M., Shibata, S., & Fukooka, F. (1970). Polysaccharides of lichens and fungi IV. Antitumor active *O*-acetylated pustulan-type glucans from lichens of *Umbilicaria* species. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 18, 1431-1434.
- Olafsdottir, E.S., Omarsdottir, S., Smestad Paulsen, B., Jurcic, K., & Wagner, H. (1999). Rhamnopyranosylgalactofuranan, a new immunologically active polysaccharide from *Thamnia subuliformis*. *Phytomedicine*, 6, 273-279.
- Olafsdottir, E. S., & Ingólfssdottir, K. (2001). Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. *Planta Medica*, 67, 99-208.
- Painter, T. J. (1983). Algal polysaccharides. In G. O. Aspinall (Ed.), *The polysaccharide (Vol. 2)* (pp. 195-285). New York: Academic Press.

- Pereyra, M. T., Prieto, A., Bernabé, M., & Leal, J. A. (2003). Studies of new polysaccharide from *Lasallia pustulata* (L.) Hoffm. *The Lichenologist*, 35, 177-185.
- Reicher, F., Corrêa, J. B.C., & Gorin, P. A. J. (1984). Location of *O*-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella* (bracatinga). A study of *O*-acetyl group migration. *Carbohydrate Research*, 135, 129-140.
- Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L., & Millet, M.A. (1954). Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, 37, 336-343.
- Teixeira, A. Z. A., Iacomini, M., & Gorin, P. A. J. (1995). Chemotypes of mannose-containing polysaccharides of lichen mycobionts: a possible aid in classification and identification. *Carbohydrate Research*, 266, 309-314.
- Wolfson, M. L., & Thompson, A. (1963a). Reduction with sodium borohydride. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2, 65-67.
- Wolfson, M. L., & Thompson, A. (1963b) Acetylation. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2, 211-215.
- Woronowicz, S. M., Pinto, B. M., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (1999). Novel structures in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substellata* and *Cladonia ibitipocae*: significance as chemotypes. *Phytochemistry*, 51, 395-402.
- Woronowicz-Barreira, S. M., Gorin, P. A. J., Sasaki, P. L., Marcelli, M. P., & Iacomini, M. (1999). Galactomannoglucans of lichenized fungi of *Cladonia* spp.: significance as chemotypes. *FEMS Microbiological Letters*, 52, 313-317.

Table 1. Partially *O*-methylated alditol acetates formed on methylation-GC-MS analysis of heteropolysaccharide (TZeFS) and its partial hydrolysis product (PHTZeFS)

<i>O</i> -Me-alditol acetates ^a	Fractions (molar % ^b)		Linkage type ^c
	TZeFS	PHTZeFS	
2,3,4,6-Me ₄ Man	15	16	Manp-(1→
2,3,5,6-Me ₄ Gal	25	3	Galp-(1→
3,4,6-Me ₃ Man	6	39	→2)-Manp-(1→
3,5,6-Me ₃ Gal	2	-	→2)-Galp-(1→
2,3,6-Me ₃ Man	-	2	→4)-Manp-(1→
2,3,6-Me ₃ Gal	1	-	→5)-Galp-(1→
2,3,4-Me ₃ Man	4	23	→6)-Manp-(1→
2,3,6-Me ₃ Glc	-	1	→4)-Glc-(1→
2,3,5-Me ₃ Gal	2	-	→6)-Galp-(1→
4,6-Me ₂ Man	4	1	→2,3)-Manp-(1→
2,3-Me ₂ Man	8	1	→4,6)-Manp-(1→
3,4-Me ₂ Man	13	14	→2,6)-Manp-(1→
2,4-Me ₂ Man	1	-	→3,6)-Manp-(1→
2,3-Me ₂ Gal	1	-	→5,6)-Galp-(1→
2-MeMan	1	-	→3,4,6)-Manp-(1→
3-MeMan	14	-	→2,4,6)-Manp-(1→
4-MeMan	3	-	→2,3,6)-Manp-(1→

^a *O*-Me-alditol acetates obtained by methylation analysis, followed by successive hydrolysis, reduction and acetylation, analyzed by GC-MS (column DB-225); ^b % of peak area relative to total peak area; ^c Based on derived *O*-methylalditol acetates

Fig. 1. Extraction, fractionation, and isolation of polysaccharides from *U. mammulata*.

Fig. 2. ^{13}C -NMR spectrum of pustulan (PM fraction) in $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ at $50\text{ }^\circ\text{C}$: chemical shifts are in δ PPM.

Fig. 3. ^{13}C -NMR spectrum of laminaran (FS-PK fraction) in $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ at $50\text{ }^\circ\text{C}$: chemical shifts are in δ PPM.

Fig. 4. Elution profiles of fractions FS-SK and TZeFS, as determined by HSPEC-MALLS with refractive index detector

Fig. 5. ^{13}C -NMR spectra of fractions TZeFS (A; galactomannan) and PHTZeFS (B; acid degraded galactomannan) with D_2O at $30\text{ }^\circ\text{C}$ as solvent: chemical shifts are in δ PPM.

Fig. 1

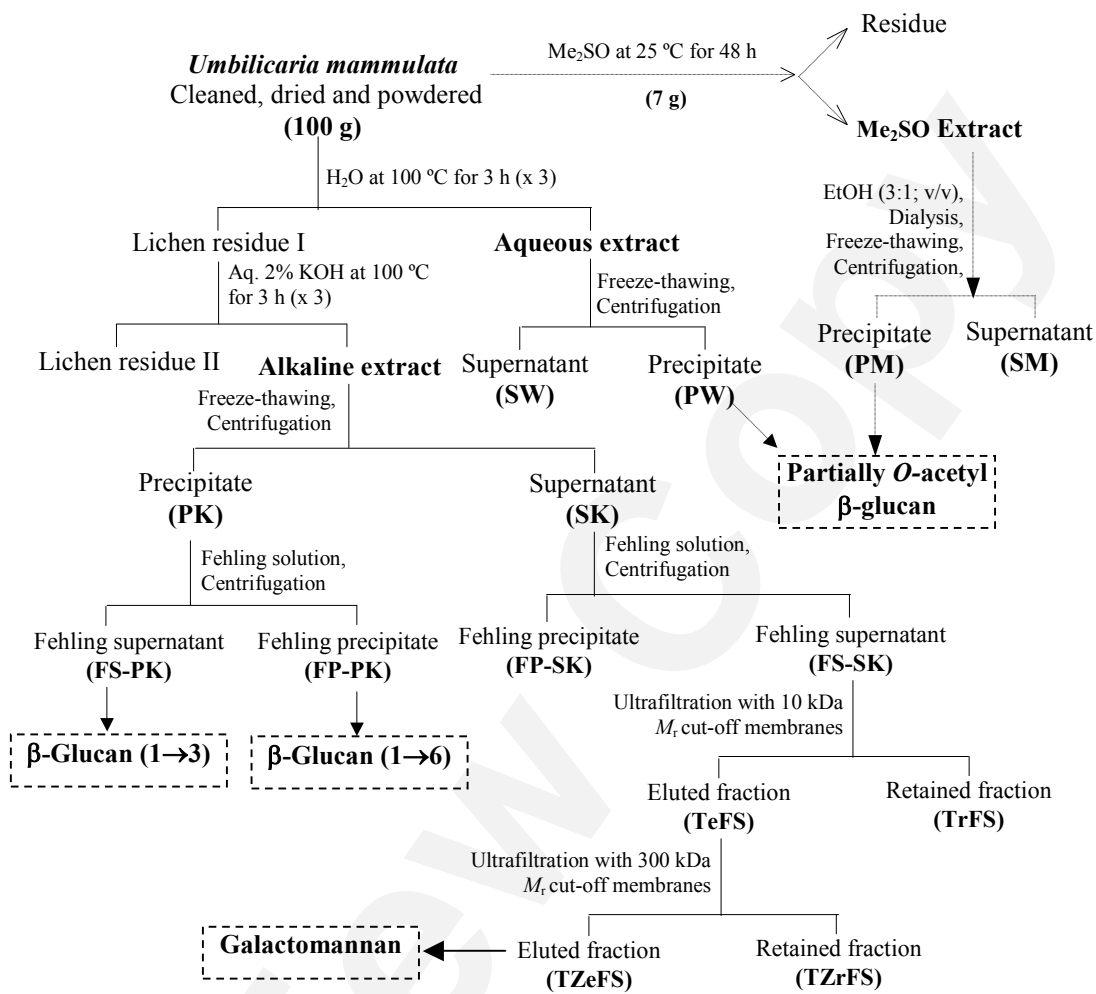


Fig. 2

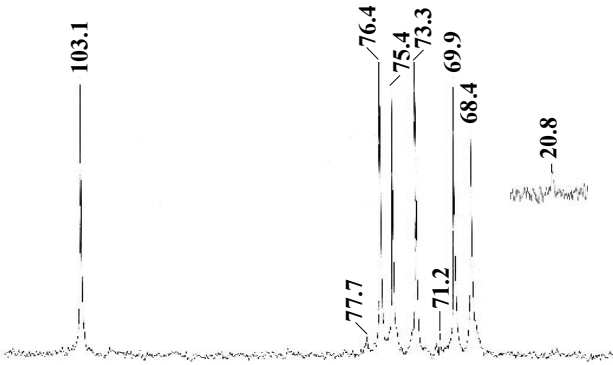


Fig. 3

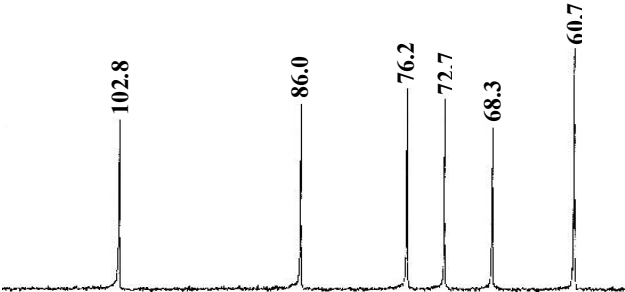


Fig. 4

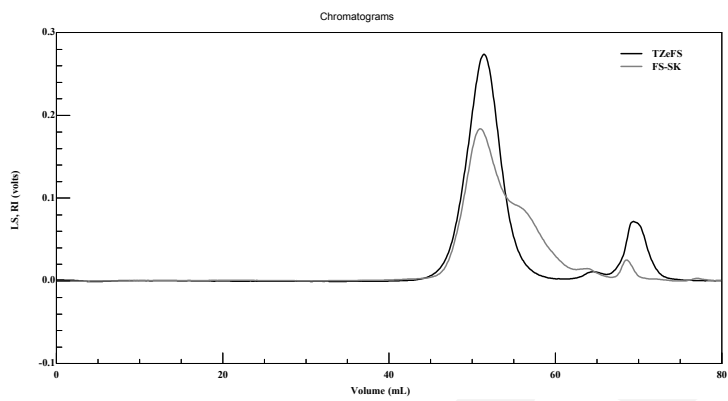
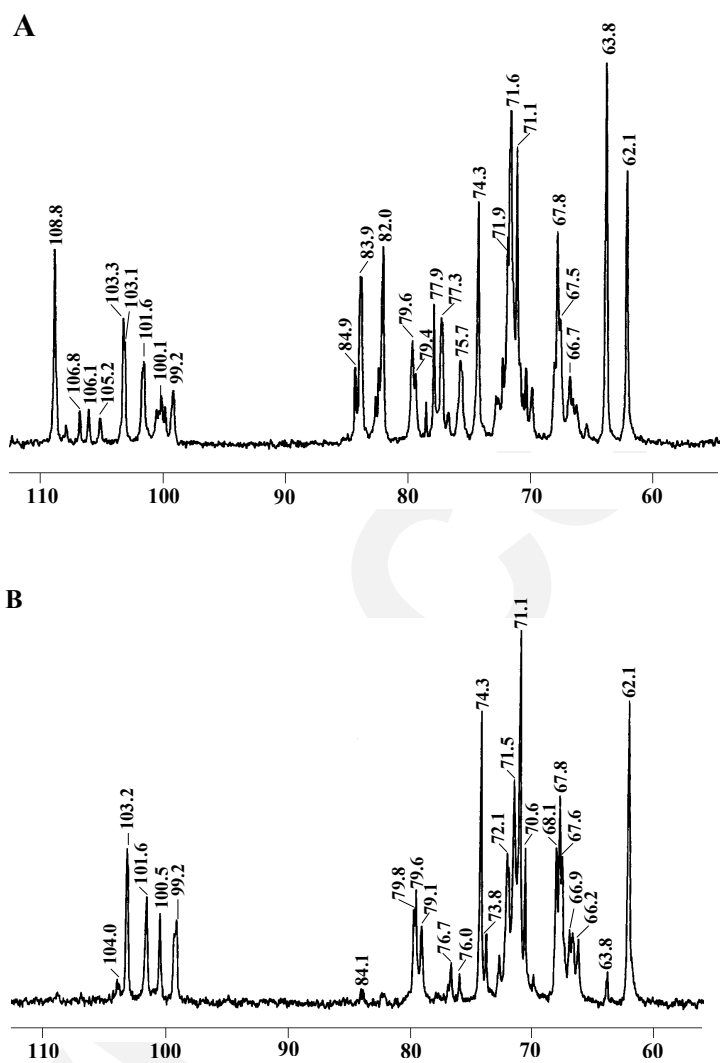


Fig. 5





Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirens* Hale

Juliana Curi Martinichen-Herrero^{a,b}, Elaine Rosechrer Carbonero^a,
Philip Albert James Gorin^a, Marcello Iacomini^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, sn,
Bairro Jd das Americas, C.P. 19046, 81531-990 Curitiba-PR, Brazil

^bUniversidade Estadual do Oeste do Paraná, C.P. 711, 85814-110 Cascavel-PR, Brazil

Received 30 July 2004; revised 18 October 2004; accepted 9 November 2004

Abstract

A β -(1 \rightarrow 6)-linked glucan (β -G) was isolated from the lichen *Parmotrema mantiqueirens* Hale and was sulfated, to give a product (β -G-SO₄) with 76.8% sulfate, corresponding to a degree of substitution of 1.95. Both β -G and β -G-SO₄ were evaluated by its activated partial thromboplastin (APTT) and thrombin time (TT), using pooled normal human plasma, and compared with that having 140 USP units/mg (porcine intestinal mucosa heparin). Anticoagulant activity was detected for β -G-SO₄, but not β -G. The in vivo antithrombotic properties of β -G-SO₄ were determined using a stasis thrombosis model in Wistar rats, with an intravenous administration of 0.5 mg/kg body weight totally inhibiting thrombus formation. It caused dose-dependent increases in tail transection bleeding time. The results obtained show that this sulfated polysaccharide is a promising anticoagulant and antithrombotic agent.

© 2004 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Anticoagulant activity; Sulfated polysaccharide; Antithrombotic

1. Introduction

Anticoagulants have been used widely for blood treatment during dialysis and surgery, as medication of disseminated intravascular coagulation and thrombosis in various diseases, and for blood testing in vitro (Tamada, 2004). Heparin, a heterogeneous sulfated polysaccharide from the growing family of known glycosaminoglycans, is widely used as a therapeutic anticoagulant and antithrombotic (Jouault et al., 2001). Heparin is a linear polysaccharide with a disaccharide repeated unit containing preponderantly of α -D-glucosamine alternating with α -L-iduronic acid. The structure of heparin is however made more complex by variation in its pattern of substitution with N- and O-sulfate, and N-acetyl groups (Mourão & Pereira, 1999).

The anticoagulant effect of heparin is expressed through binding of the polysaccharide to antithrombin (AT), which

leads to acceleration of the rate at which this proteinase inhibitor complexes with and thereby inactivates the enzymes involved in blood coagulation (Razi et al., 1995). Heparin has a specific pentasaccharide sequence that mediates the interaction with AT (Atha, Lormeau, Petitou, Rosemberg, & Choay, 1985; Lindahl, Balckstroem, Thumberg, & Leder, 1980). Heparin suffer from number of major disadvantages, these include extreme structural diversity, problems with animal pathogen contamination due to its animal origin, poor bioavailability, the problem of heparin-induced thrombocytopenia developing in some heparin recipients, and the risk of bleeding (Beijering, ten Cate, & ten Cate, 1996; Hirsh, 1991).

Attempts have been made to develop new anticoagulant and antithrombotic drugs. Various studies have concerned new sulfated polysaccharides that show anticoagulant/antithrombotic properties. Sulfated polysaccharides that are either of natural, semisynthetic, or synthetic origin, among them dextran sulfate, chitin and chitosan sulfate, carrageenan, and others, have multiple biological activities including

* Corresponding author. Tel.: +55 41 361 1655; fax: +55 41 266 2042.
E-mail address: iacomini@ufpr.br (M. Iacomini).

anticoagulant and antithrombotic activities (Huang, Du, Yang, & Fan, 2003). These polysaccharides show no structural homology with heparin, except high sulfate contents (Jouault et al., 2001). It is generally accepted that the anticoagulant activity of the polysaccharides partly results from the strong interaction between the negatively charged sulfated groups and some positively charged peptidic sequences (Bourin & Lindahl, 1993).

We also describe the preparation of a sulfated glucan (β -G-SO₄) by esterefication of a β -(1 \rightarrow 6)-linked glucan (β -G), extracted from the lichenized fungus *Parmotrema mantiqueirens* Hale. β -G-SO₄ was then examined for its anticoagulant and antithrombotic properties.

2. Experimental

2.1. Lichenized fungus

The lichenized fungus *P. mantiqueirens* Hale (Parmeliaceae family) was collected in 1996, in Lapa, State of Paraná, Brazil. It was identified by Prof. Dra. Sionara Eliasaro (Department of Botanic of the Federal University of Paraná-UFPR) and has its voucher (No. 33355) deposited in the Herbarium UPCB of UFPR.

2.2. Materials

Heparin from porcine intestinal mucosa (140 USP units/mg) was obtained from Sigma (St Louis, MO) and rabbit brain thromboplastin from Instrumentation Laboratory (Lexington, MA). Normal human plasma was obtained by centrifugation (2000 \times g for 15 min at 22 °C) of citrated normal human plasma (1/10 vol. of 3.8% trisodium citrate) from a pool of healthy volunteer donors, and frozen at –20 °C in aliquots of 0.5 ml until further use. Activated partial thromboplastin (APTT) and PT were determined with reagents from Instrumentation Laboratory (Lexington, MA) and thrombin time (TT) with those from Behring (Marburg, Germany). Pyridine, formamide, chlorosulfonic acid, methanol, ethanol, and trifluoroacetic acid were from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

2.3. Isolation of glucan and its sulfation

A lichen sample (100 g) was successively refluxed in CHCl₃–MeOH (500 ml, 2:1 v/v) and 80% aqueous MeOH (500 ml), in order to extract low molecular components. The residual material was then extracted successively with 2 and 10% aq. KOH (800 ml) containing a trace of NaBH₄ at 100 °C for 3 h. The extracts obtained with 10% aq. KOH were combined, neutralized with HOAc, dialyzed against tap water for 72 h, and the retained solution was freeze thawed to give a precipitate and supernatant. The latter was then treated with Fehling solution (Jones & Stoodley, 1965)

and resulting precipitate of Cu⁺⁺ complexes removed. These were neutralized with HOAc, dialyzed against tap water and deionized with mixed ion exchange resins, giving rise to a glucan (β -G, 2.1 g).

β -G was sulfated according to the method described by O'Neill (1995) with slight modifications as follows. The native polysaccharide (2.0 g) was solubilized in formamide (100 ml) and pyridine (100 ml) by vigorous stirring for 24 h, followed by dropwise addition of chlorosulfonic acid (25 ml) over 1 h at 0 °C, the mixture being maintained at 4 °C for 12 h. Ice-water was added, followed by 10% (w/v) aqueous NaHCO₃ until effervescence ceased. The solution was then dialyzed against water to remove pyridine, salts, and potential degradation products and then freeze dried, providing the sodium salt of the sulfated glucan. Sulfated glucan was stored until use in a desiccator. The degree of substitution (DS) of sulfated derivative was determined by hydrolysis with 1 M HCl for 5 h at 100 °C, the resulting BaSO₄ being measured turbidimetrically (Dodgson & Price, 1962).

2.4. Monosaccharide composition

Hydrolysis was carried out with 1 M TFA at 100 °C for 8 h and the hydrolyzates then evaporated to dryness, followed by successive reduction with NaBH₄ and acetylation with Ac₂O–pyridine (1:1, v/v; 2 ml) at room temperature for 12 h (Wolfson & Thompson, 1963a,b). The resulting alditol acetates obtained were analyzed by GC-MS using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap, model 810 R-12 mass spectrometer, with a DB-225 capillary column (30 m–0.25 mm i.d.), and He as carrier gas. The analysis was carried out from 50 to 220 °C at 40 °C/min maintaining the temperature constant at the end of the gradient (18 min).

2.5. Methylation analysis

Fractions β -G and β -G-SO₄ (5 mg) were per-*O*-methylated according to the method of Ciucanu and Kerek (1984), using powdered NaOH in Me₂SO–MeI. The per-*O*-methylated derivatives were treated with refluxing 3% HCl–MeOH for 2 h at 80 °C, and then with 0.5 M H₂SO₄ at 100 °C for 14 h, followed by neutralization with BaCO₃. The resulting mixtures of *O*-methylaldoses were reduced with NaBH₄ and acetylated as cited above to give a mixture of partially *O*-methylated alditol acetates, which was analyzed by GC-MS. The analysis was carried out from 50 to 215 °C at 40 °C/min maintaining the temperature constant at the end of the gradient (31 min). The resulting partially *O*-methylated alditol acetates were identified by their typical electron impact breakdown profiles and retention times (Jansson, Kenne, Liedgren, Lindberg, & Lönngren, 1976).

2.6. Determination of homogeneity and molar mass

The elution profile of fraction β -G was determined by high performance size-exclusion chromatography (HPSEC), using a WATERS 510 HPLC pump at 0.6 ml/min with four gel permeation columns in series with exclusion sizes of 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , and 5×10^3 Da, using a refractive index (RI) detector. The eluent was 0.1 mol/l aq. NaNO_3 containing 200 ppm aq. NaN_3 . Samples, previously filtered through a membrane (0.22 μm ; Millipore), were injected (250 μl loop) at a 2 mg/ml concentration.

The specific RI increment (dn/dc) was determined for fraction β -G. The sample was dissolved in 50 mM NaNO_3 and five increasing concentrations, ranging from 0.2 to 0.7 mg/ml, were used to determine the slope of the increment. Results were processed in software provided by the manufacturer (Wyatt Technologies).

2.7. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

NMR spectra were obtained using a 400 MHz Bruker model DRX Avance spectrometer with a 5 mm inverse probe. ^{13}C -NMR (100.6 MHz) and ^1H -NMR (400.13 MHz) analyses were performed at 50 or 30 $^\circ\text{C}$ on sample dissolved in D_2O . Chemical shifts of samples are expressed in ppm (δ) relative to acetone at δ 30.20 and 2.22 for ^{13}C and ^1H signals, respectively.

2.8. Clotting assay

The assay was carried out using heparin, β -G and β -G- SO_4 , dissolved in saline at various concentrations. Normal human plasma (90 μl) was mixed with 10 μl of a solution of β -G- SO_4 (0–20 μg), β -G (0–2 mg) or heparin (0–20 μg). For controls, saline was added to plasma in a ratio of 1:10. APTT measurements were performed using a kit obtained from Instrumentation Laboratory (IL testTM, Lexington, MA). Plasma (100 μl), containing various concentrations of β -G- SO_4 , β -G or heparin, was incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 1 min. One hundred microliter of bovine cephalin was then added and incubated at 37 $^\circ\text{C}$. After 3 min incubation, 100 μl of pre-warmed 0.25 M CaCl_2 solution were added to the mixtures and the clotting time was measured in quadruplicate using a COAG-A-MATE[®] XM coagulometer (Organon Teknika Corporation, Durham, NC) up to 300 s. For determination of TT, normal human plasma (100 μl) containing various concentrations of heparin, β -G and β -G- SO_4 , was incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 2 min, at which the thrombin time reagent, 200 μl , (Behring, Marburg, Germany) was added. The time for the appearance of a fibrin clot (s) was measured up to 300 s using a COAG-A-MATE[®] XM coagulometer (Organon Teknika Corporation, Durham, NC). For determination of PT, normal human plasma (100 μl) containing various concentrations of heparin, β -G and β -G- SO_4 was incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for

2 min, then, 200 μl of rabbit brain calcium tromboplastin was added and the clotting time recorded using a COAG-A-MATE[®] XM coagulometer. All assays were performed in duplicate and repeated at least three times on different days ($n=6$).

2.9. Animals

Experiments were conducted on male Wistar rats weighing 250–300 g, which were anesthetized with a mixture of ketamine (Fort Dodge; 100 mg/kg intramuscularly) and xylazine (Virbac; 16 mg/kg intramuscularly).

All recommendations of the Brazilian National Law (No. 6.638, 05 November 1979) for scientific management of animals were respected.

2.10. Ex vivo determination of APTT

Animals were anesthetized as described above and the carotid artery was carefully exposed and dissected free from surrounding tissue. Heparin (0–500 $\mu\text{g/kg}$), vehicle (PBS) or β -G- SO_4 (0–1 mg/kg) was administered into the carotid artery. After 5, 15, 30 and 60 min samples of blood was collected (0.5 ml in 3.8% trisodium citrate, 9:1, v/v). Each blood sample was centrifuged ($2000 \times g$, 10 min) and plasma was stored at -20°C until use. APTT was determined using a kit obtained from Instrumentation Laboratory (IL testTM, Lexington, MA). Plasma (100 μl), was incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 1 min. One hundred microliter of bovine cephalin was then added and incubated at 37 $^\circ\text{C}$. After 3 min of incubation, 100 μl of pre-warmed 0.25 M CaCl_2 solution were added to the mixtures and the clotting time was measured using a COAG-A-MATE[®] XM coagulometer (Organon Teknika Corporation, Durham, NC) up to 300 s. For each treatment group ($n=6$) the mean ex vivo APTT \pm SD was determined.

2.11. Tail transection bleeding time

For evaluation on the bleeding effect, rats were anesthetized as described above. The right carotid artery of animals was cannulated for administration of β -G- SO_4 (0.1–1 mg/kg), vehicle (PBS), or heparin (25–100 $\mu\text{g/kg}$). Bleeding was induced by section of the tail extremity 3 mm from the tip. The tails were blotted with tissue paper every 30 s and the time up to cessation of bleeding were noted. The compounds were administered 5 min before tail transection. For each treatment group ($n=6$) the mean bleeding time \pm SD was determined.

2.12. Stasis-induced venous thrombosis model

Thrombus formation was induced by promoting a combination of stasis and hypercoagulability (Berry, Girardi, Lochot, & Lecoffre, 1994). Rats were anesthetized and their right carotid artery was cannulated for injection of

β -G-SO₄, vehicle (PBS), heparin, and thromboplastin. The abdomen of each animal was opened surgically and, after careful dissection, the abdominal vena cava was exposed and dissected free from the surrounding tissue, all its side-branches being ligated between the left renal and femoral veins. β -G-SO₄ (0.25–2 mg/kg), heparin (25–100 μ g/kg), or vehicle, were administered as a single bolus injection. After 5 min, thrombus formation was induced by the injection by thromboplastin (10 mg/kg) followed 10 s later by stasis of a 1 cm segment of the abdominal vein cava, which was maintained for 20 min. The formed thrombus was removed, immediately blotted twice on paper and weighed. For each treatment group ($n=6$) the mean thrombus weight \pm SD was determined.

2.13. Statistics

All results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). To analyze the data statistically, we performed one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements of the same variable, and used Tukey test to determine which means were significantly different from that of the control. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Chemical characterization of β -G and β -G-SO₄

The precipitate obtained using Fehling solution (fraction β -G; 2.1% yield), contained glucose as the main component. HPSEC analysis showed a homogeneous profile with $M_r = 4.2 \times 10^5$ kDa ($dn/dc = 0.141$). Their ¹³C NMR spectra containing six signals of equal area, identical to those of a (1 \rightarrow 6)-linked β -glucan (pustulan) (Sasaki et al., 2002). The β -configuration was confirmed by virtue of a high-field H-1 signal at δ 4.51 and a low field C-1 at δ 103.5. The C-6 signal at δ 69.3 shows 6-*O*-substitution of Glcp units, confirmed by a corresponding inverted CH₂ signal in the DEPT spectrum. The other signals observed at δ 73.6, 76.1, 70.0, and 75.4 corresponding to C-2, C-3, C-4, and C-5, respectively. These data are in agreement with those of a methylation analysis, which showed only the derivatives 2,3,4,6-Me₄-Glcp (0.6%) and 2,3,4-Me₃-Glcp (99.4%).

Comparison of methylation analysis data for β -G and β -G-SO₄ demonstrated that sulfate groups were inserted principally in the OH-groups at C-2 and C-4. It was observed unsulfated internal chain units (13%), unsulfated non-reducing end units (0.4%), 4-*O*-sulfated units (20.3%), 2-*O*-sulfated units (25.6%), 3-*O*-sulfated units (5.1%), 2,4-di-*O*-sulfated unit (30.0%), and 2,3,4-tri-*O*-sulfated units (5.6%).

3.2. In vitro anticoagulant activity of β -G-SO₄

The anticoagulant activity of β -G-SO₄ was investigated by the classical coagulation assays APTT, TT and PT, using heparin (140 USP units/mg) as a reference. APTT is related to the intrinsic coagulation phase in plasma, PT with the extrinsic phase, and TT with the third coagulation phase in plasma. These tests are often referred to as functional tests because they monitor clot formation. (Leadley, Chi, Rebello, & Gagnon, 2000). Table 1 illustrates the anticoagulant activity of β -G-SO₄, β -G and heparin as measured by APTT, TT and PT. β -G-SO₄ was able to prolong APTT and TT in a concentration-dependent manner. β -G-SO₄ prolonged APTT and TT beyond 300 s at concentrations greater than 14 μ g/ml, 2.4-fold more β -G-SO₄ than heparin being required to prolong APTT and TT to 300 s. At 8, 10 and 12 μ g/ml of plasma, the anticoagulant activity was ~ 4.4 (119.8 ± 1.9 s), 7.4 (202.6 ± 1.0 s) and, 9.5 (261.1 ± 1.6 s) times greater than that of the control (27.4 s), in respect to APTT. The anticoagulant effect of the β -G-SO₄ was also evaluated by the TT test, the anticoagulant activity being about 8.6 (160.7 ± 1.1 s), 11.5 (215.9 ± 0.7 s), and 14.0 (262.5 ± 0.8 s) times greater than that of the control (18.7 s) at the same concentrations. The prolongation of APTT suggested inhibition of the intrinsic coagulation pathway, whereas prolongation of TT indicated inhibition of thrombin-mediated fibrin formation. Similar to heparin, the weakest effect was observed in the PT assay for the sulfated polysaccharide. Since the anticoagulant effect of heparin is not mainly mediated by a modulation of the extrinsic system, it appears that β -G-SO₄ is a poor inhibitor of the extrinsic pathway. The relative lack of a β -G-SO₄ effect on the PT is consistent with the observation that this test is also not sensitive to heparin and several other sulfated polysaccharides (Yoon et al., 2002). β -G did not inhibit APTT, TT and PT assays, because the presence of sulfated groups is an essential requirement for anticoagulant activity (Huang et al., 2003). β -G-SO₄ showed an important in vitro anticoagulation action, evidenced by a increased dose-dependence of APTT and TT. This action results from its high level of negative charge density produced by the sulfate groups (DS 1.95). The anticoagulant activity increased with the sulfate ester content, indicating the sulfate esters played a major role in its biological activity.

3.3. Stasis-induced venous thrombosis model

The antithrombotic efficacy of β -G-SO₄ was evaluated in rats by the stasis-induced venous thrombosis model, being observed on thrombus formation (Fig. 1). In vehicle-treated rats, the average thrombus weight was 23.4 ± 1.7 mg. The inhibition of thrombus formation increased in a dose-dependent manner. The percentage of thrombosis inhibition was 24.3, 64.5 and 83.5% at 0.05, 0.1 and 0.3 mg/kg body weight, respectively.

Table 1

Anticoagulant activity measured by activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), and prothrombin time (PT) of normal human plasma containing β -G, β -G-SO₄ and heparin

Derivative	APTT		TT		PT	
	Plasma (μ g/ml)	Time (s)	Plasma (μ g/ml)	Time (s)	Plasma (μ g/ml)	Time (s)
Native glucan (β -G)	0	27.7 \pm 0.8 ^a	0	18.7 \pm 0.5 ^a	0	15.4 \pm 0.5 ^a
	10	27.7 \pm 0.8 ^a	10	18.7 \pm 0.5 ^a	10	15.4 \pm 0.5 ^a
	50	27.7 \pm 0.8 ^a	50	18.7 \pm 0.5 ^a	50	15.4 \pm 0.5 ^a
	500	27.7 \pm 0.8 ^a	500	18.7 \pm 0.5 ^a	500	15.4 \pm 0.5 ^a
	1000	27.7 \pm 0.8 ^a	1000	18.7 \pm 0.5 ^a	1000	15.4 \pm 0.5 ^a
Sulfated glucan (β -G-SO ₄)	0	27.7 \pm 0.8 ^a	0	18.7 \pm 0.5 ^a	0	15.4 \pm 0.5 ^a
	2	45.0 \pm 1.2 [*]	2	21.5 \pm 1.2 [*]	2	16.9 \pm 1.1
	4	64.7 \pm 1.6 [*]	4	56.1 \pm 0.6 [*]	4	17.0 \pm 1.4
	6	95.8 \pm 0.9 [*]	6	100.3 \pm 0.9 [*]	6	18.8 \pm 1.1 [*]
	8	119.8 \pm 1.9 [*]	8	160.7 \pm 1.1 [*]	8	20.3 \pm 1.1 [*]
	10	202.6 \pm 1.0 [*]	10	215.9 \pm 0.7 [*]	10	21.3 \pm 1.0 [*]
	12	261.1 \pm 1.6 [*]	12	262.5 \pm 0.8 [*]	12	22.3 \pm 1.2 [*]
Heparin ^c	14	> 300 ^b	14	> 300 ^b	14	26 \pm 1.1 [*]
	0	27.7 \pm 0.8 ^a	0	18.7 \pm 0.5 ^a	0	15.4 \pm 0.5 ^a
	2	85.2 \pm 1.3 [*]	2	59.6 \pm 1.1 [*]	2	17.0 \pm 0.6 [*]
	4	169.2 \pm 1.1 [*]	4	105.3 \pm 0.9 [*]	4	17.5 \pm 0.4 [*]
	6	> 300 ^b	6	> 300 ^b	6	18.0 \pm 0.5 [*]

Results are expressed as means time \pm SD ($n=6$ /group). Statistical significance compared to control values is denoted by asterisks where $*p<0.05$ versus controls, Tukey's tests.

^a Coagulation time similar to that of pooled human plasma. Standard values (26–37, 14–21, and 11–16 s for APTT, TT, and PT, respectively).

^b No statistical tests were performed with times longer than 300 s.

^c Heparin from porcine intestinal mucosa at a concentration of 140 USP units/mg.

β -G-SO₄ was an effective antithrombotic agent, and prevented thrombosis in a dose-dependent manner and a dose of 0.5 mg/kg body weight completely prevented thrombosis after 20 min stasis. Unfractionated heparin was more effective than β -G-SO₄ and completely prevented thrombosis in the same experimental model, at a dose of 0.1 mg/kg body weight. We evaluated the antithrombotic properties of β -G-SO₄ using a venous stasis model in rats (Berry et al., 1994). Many models of thrombosis have been developed for rodents, for antithrombotic efficacy on the venous side, several compounds were evaluated using methods that cause stasis of blood in inferior vena cava. In this model, a section of the vena cava is isolated and ligated so that the stasis in this region promotes thrombus generation. The lack of antithrombotic activity of the native glucan, demonstrated the importance of the sulfate groups for antithrombotic activity, as was observed for its anticoagulant action. When other sulfated polysaccharides were compared with β -G-SO₄, we observed that a chemically sulfated (1 \rightarrow 3)-linked β -glucan completely inhibited thrombus formation, but only at a concentration 20 times greater than that of unfractionated heparin (Alban, Jeske, Welzel, Franz, & Fareed, 1995) and a fucosylated chondroitin sulfate completely inhibited thrombus formation at a dose of 1.5 mg/kg body weight, 25 times greater than unfractionated heparin (Mourão, Guimarães, Mulloy, Thomas, & Gray, 1998). Only a concentration 4 times greater of β -G-SO₄ was necessary to obtain the same effect as heparin.

3.4. Ex vivo determination of APTT

In order to determine whether β -G-SO₄ could exert its anticoagulant action in vivo, we tested for APTT ex vivo

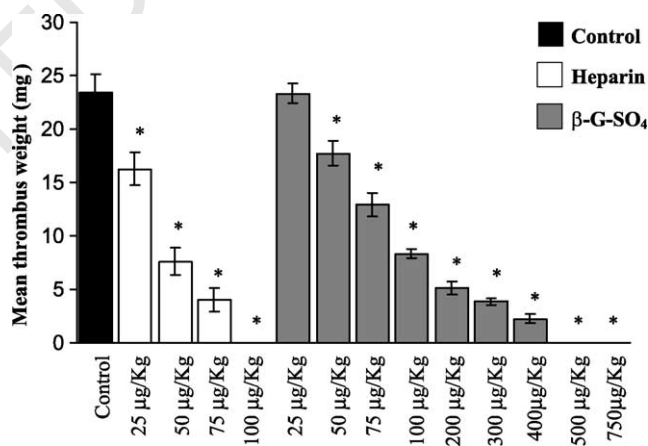


Fig. 1. Effects of β -G-SO₄ on the stasis-induced venous thrombosis model. After being cannulated, the abdomen of each animal was opened surgically and the abdominal vena cava was exposed, all its side-branches being ligated between the left renal and femoral veins. The β -G-SO₄ (25–750 μ g/kg) (hatched columns), heparin (25–100 μ g/kg) (open columns) or vehicle (PBS) (filled columns) was administered. After 5 min, thrombus formation was induced by the injection by thromboplastin (10 mg/kg) followed 1 min later by stasis of a 1 cm segment of the abdominal vein cava, which was maintained for 20 min. The formed thrombus was removed, immediately blotted twice on paper and weighed. For each treatment group ($n=6$) the mean thrombus weight \pm SD was determined. Statistical significance compared to control values is denoted by asterisks where $*p<0.05$ versus controls, Tukey's tests.

Table 2
Ex vivo anticoagulant activity of β -G-SO₄

Polysaccharide	APTT ex vivo ^a		Polysaccharide	APTT ex vivo ^a	
	Plasma (μ g/kg)	Time (s)		Plasma (μ g/kg)	Time (s)
Sulfated glucan (β -G-SO ₄)	0	19.7 \pm 1.1 ^b	Heparin ^c	0	19.7 \pm 1.1 ^b
	200	53.2 \pm 0.8*		50	19.7 \pm 1.2
	300	82.2 \pm 0.8*		75	21.1 \pm 1.4
	500	150.7 \pm 1.2*		100	41.3 \pm 0.9*
	600	174.8 \pm 1.2*		200	57.3 \pm 0.8*
	800	246.3 \pm 0.9*		300	108.9 \pm 1.0*
	900	273.1 \pm 0.9*		400	161.1 \pm 1.5*
	1000	> 300 ^d		500	> 300 ^d

Results are expressed as means time \pm SD ($n=6$ /group). Statistical significance compared to control values is denoted by asterisks where * $p < 0.05$ versus controls, Tukey's tests.

^a β -G-SO₄ and heparin at the indicated doses were administered intravenously 5 min before collection of blood samples (0.5 ml) into 3.8% trisodium citrate (9:1, v/v). APTT was determined on ex vivo rat plasma as described in Section 2.2.

^b Coagulation time similar to that of pooled rat plasma.

^c Heparin from porcine intestinal mucosa at a concentration of 140 USP units/mg.

^d No statistical tests were performed with times longer than 300 s.

using a rat model. APTT determined for β -G-SO₄ doses of 200, 300, 500, 600, 800, 900 and 1000 μ g/kg, after 5 min of drug administration, was increased in a dose-dependent manner by 2.7, 4.2, 7.6, 8.9, 12.5, 13.8 and > 15.3-fold, respectively (Table 2). Twofold more β -G-SO₄ than heparin was required to prolong APTT to 300 s. This result indicates that the β -G-SO₄ has an anticoagulant action in vivo.

3.5. Tail transection bleeding time

The tail rat transection bleeding time was measured to determine the antihemostatic effects of β -G-SO₄. The effect of β -G-SO₄ was assessed based on blood loss from a cut rat tail, after intravascular administration of the polysaccharide.

Table 3
Effects of β -G-SO₄ on the tail transection bleeding time in rat

Compound	Dose (μ g/kg)	Bleeding time (s) ^a	Increase (%)
Vehicle	–	960 \pm 50.2	–
β -G-SO ₄	100	920 \pm 77.4	–
	250	960 \pm 82.7	–
	500	1425 \pm 125.5*	48.4
	1000	2000 \pm 164*	108.3
Heparin ^b	25	945 \pm 56.1	–
	50	1380 \pm 65.7*	43.7
	75	2075 \pm 44.1*	116.1
	100	2685 \pm 64.8*	179.7

Effects of β -G-SO₄ on the tail transection bleeding time in rat. Statistical significance compared to control values is denoted by asterisks where * $p < 0.05$ versus controls, Tukey's tests.

^a The left jugular vein of animals was cannulated for intravenous injection of (0.1–1 mg/kg), vehicle (PBS) or heparin (25–100 μ g/kg). After 5 min, bleeding was induced by section of the extremity of the tail 3 mm from the tip. The tails were blotted with tissue paper every 30 s the time to cessation of bleeding was noted. For each treatment group the mean bleeding time \pm SD was determined for $n=6$ /group.

^b Heparin from porcine intestinal mucosa at a concentration of 140 USP units/mg.

Both heparin and β -G-SO₄ caused dose-dependent increases in the tail transection bleeding time (Table 3). In the vehicle-treated control group, the bleeding time averaged at 960 \pm 50.2 s ($n=6$). β -G-SO₄ caused an increase in bleeding time of 48.4 and 108.3% at 500 and 1000 μ g/kg body weight, respectively. Heparin produced a strong hemorrhagic effect at 100 μ g/kg: the increased in bleeding times was 179.7%. The ideal clinical anticoagulant would reliably and predictably inhibit thrombin without substantially increasing the risk of bleeding (Guglielmone, Agnese, Montoya, & Cabrera, 2002). According to our results, β -G-SO₄ produced a short prolongation of the rat tail transection bleeding time, when compared with heparin.

4. Conclusion

Our study shows that β -G-SO₄ is effective in vitro and in vivo as an anticoagulant and antithrombotic agent for thrombosis in rats. These results suggest that β -G-SO₄ may be a promising antithrombotic agent for the treatment of various thrombotic diseases.

Acknowledgements

The authors would like to thank Depto. de Bioquímica Médica (Laboratório de Tecido Conjuntivo, UFRJ, RJ, Brazil), for technical support in the in vivo experiments, Dra. Lismara Kafka do Bonfim (Hospital de Clínicas, Curitiba, PR, Brazil) for collecting human plasma, Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche 'G. Ronzoni', Italy, for NMR analyses, and the Brazilian agencies, CNPq, CAPES, PRONEX-Carboidratos and Fundação Araucária for financial assistance. The authors are grateful to Welligton L. Braguini for the statistical analyses.

References

- Alban, S., Jeske, W., Welzel, D., Franz, G., & Fareed, J. (1995). Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisynthetic β -1,3-glucan sulfate. *Thrombosis Research*, 78(93), 201–210.
- Atha, D. H., Lormeau, J. C., Petitou, M., Rosemberg, R. D., & Choay, J. (1985). Contribution of monosaccharide residues in heparin binding to antithrombin III. *Biochemistry*, 24, 6723–6729.
- Beijering, R. J. R., ten Cate, H., & ten Cate, J. W. (1996). Clinical applications of new antithrombotic agents. *Annals of Hematology*, 72, 177–183.
- Berry, C. N., Girardi, D., Lochot, S., & Lecoffre, C. (1994). Antithrombotic actions of argatroban in rat models of venous, mixed and arterial thrombosis, and its effects on the tail transection bleeding time. *British Journal of Pharmacology*, 113, 1209–1214.
- Bourin, M. C., & Lindahl, U. (1993). Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochemical Journal*, 289, 313–330.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209–217.
- Dodgson, K. S., & Price, R. G. (1962). A note on the determination on the ester sulfate. *Biochemical Journal*, 84(1), 106–110.
- Guglielmone, H. A., Agnese, A. M., Montoya, S. C. N., & Cabrera, J. L. (2002). Anticoagulant effect and action mechanism of sulphated flavonoids from *Flaverina bidentis*. *Thrombosis Research*, 105, 183–188.
- Hirsh, J. (1991). Heparin. *The New England Journal of Medicine*, 324, 1565–1574.
- Huang, R., Du, Y., Yang, J., & Fan, L. (2003). Influence of functional groups on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulfate. *Carbohydrate Research*, 338, 483–489.
- Jansson, P., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B., & Lönngren, J. (1976). A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Journal of Chemical Society Chemical Communications*, 48, 1–70.
- Jones, J. K. N., & Stoodley, R. J. (1965). Fractionation using copper complexes. *Methods Carbohydrate Chemistry*, 5, 36–38.
- Jouault, S. C., Chevolut, L., Helley, D., Ratiskol, J., Bros, A., Sinquin, C., et al. (2001). Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1528, 141–151.
- Leadley, R. J., Chi, L., Rebello, S. C., & Gagnon, A. (2000). Contribution of in vivo models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 43, 101–116.
- Lindahl, U., Balckstroem, G., Thumberg, L., & Leder, J. G. (1980). Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proceedings of the National Academy of Science*, 77, 6551–6555.
- Mourão, P. A. S., Guimarães, M. A. M., Mulloy, B., Thomas, S., & Gray, E. (1998). Antithrombotic activity of a sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. *British Journal of Haematology*, 101, 647–652.
- Mourão, P. A. S., & Pereira, M. S. (1999). Searching for alternatives to heparin: Sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 9(8), 225–232.
- O'Neill, A. N. (1995). Sulphated derivatives of laminarin. *Canadian Journal of Chemistry*, 33, 1097–11101.
- Razi, N., Feyzi, E., Björk, I., Naggi, A., Casu, B., & Lindahl, U. (1995). Structural and functional properties of heparin analogues obtained by chemical sulphation of *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide. *Biochemistry Journal*, 309, 465–472.
- Sasaki, G. L., Ferreira, J. C., Glienke-Blanco, C., Torri, G., de Toni, F., Gorin, P. A. J., et al. (2002). Pustulan and branched β -galactofuranan from the phytopathogenic fungus *Guignardia citricarpa*, excreted from media containing glucose and sucrose. *Carbohydrate Polymers*, 48(4), 385–389.
- Yoon, S.-J., Pereira, M. S., Pavão, M. S. G., Hwang, J.-K., Pyun, Y.-R., & Mourão, P. A. S. (2002). The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. *Thrombosis Research*, 106, 51–58.
- Tamada, Y. (2004). Sulfation of silk fibroin by chlorosulfonic acid and anticoagulant activity. *Biomaterials*, 25, 377–383.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963a). Reduction with sodium borohydride. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2, 65–67.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963b). Acetylation. *Carbohydrate Chemistry*, 2, 211–215.